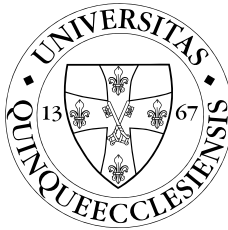


Doktori (PhD) – értekezés tézisei

**Ochratoxin A molekuláris interakcióinak
vizsgálata *in vitro* modell rendszerekben**



Dr. Poór Miklós

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Kőszegi Tamás

Programvezető: Prof. Dr. Miseta Attila

Doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Kovács L. Gábor

Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Laboratóriumi Medicina Intézet

2014

1. Bevezetés

Az Ochratoxinok elsősorban *Penicillium* és *Aspergillus* fajok szekunder anyagcseretermékei. Kémiai szerkezetük alapján Ochratoxin A, B és C toxinokat különböztetünk meg, ezek közül az Ochratoxin A (OTA) magasan a legtoxikusabb származék. Az OTA alapvázát egy dihidroizokumarin molekula adja, amelyhez fenilalanin-struktúra kapcsolódik. Főként a Balkán régióban forduló elő, de világszerte kimutatható gabonafélékben, gyümölcsökben, pékárukban, kávéban, borban, sörben, hús- és tejtermékekben, de még tojásban is. Széles előfordulása és magas hőstabilitása miatt az OTA teljes eradikációja a táplálékláncból a jelenleg ismert módszerekkel egyelőre lehetetlennek tűnik.

A toxin enterális úton jut a szervezetbe, orális biohasznosulása magas (emberben 93%). Miután a véráramba jut, több mint 99%-ban szérumfehérjékhez, nagyrészt albuminhoz kötődik, ez a fő oka a toxin rendkívül hosszú plazmafelezési idejének (~1 hónap). Az OTA dianion formában kötődik humán szérumalbuminhoz (HSA), az elsődleges kötőhely a IIA aldoméren helyezkedik el. Egyes állatkísérletek rámutattak, hogy az OTA leszorítása albuminról drasztikusan felgyorsítja a toxin kiürülését, és meggátolja szöveti akkumulációját. A toxin nagyrészt vizelettel ürül ki a szervezetből.

Az OTA elsősorban nefrotoxikus, de egyéb kedvezőtlen hatásairól is beszámol a szakirodalom. Számos vizsgálat történt annak érdekében, hogy feltárják az OTA pontos hatásmechanizmusát: *in vitro* és *in vivo* kísérletek eredményei alapján rengeteg elméletet ismerünk, azonban még napjainkban is kevés ténnyel rendelkezünk. Szakirodalmi adatok alapján a lehetséges hatásmechanizmusok a következők: fehérjeszintézis- és celluláris energiatermelés gátlása, DNS-adduktok képzése, oxidatív/nitrozatív stressz indukciója, kalcium-homeosztázis felborítása, apoptózis indukció és a sejtosztódás gátlása. A toxinxpozícióval szemben jelenleg nem ismerünk igazoltan hatékony prevencióstratégiát vagy antidótumot.

Az OTA a szervezetben számos anyaggal lép interakcióba, köztük ionokkal, különböző peptidokkal és fehérjékkel. Ezen kölcsönhatások között valószínűleg az egyik legjelentősebb a toxin kötődése albuminhoz, ami az OTA toxikokinetikájában meghatározó tényező. Az OTA molekuláris interakcióinak további vizsgálata indokolt, és szükséges ahhoz, hogy mélyebb szinten megértsük a toxin szervezetbeni viselkedését, továbbá, hogy hatékony prevencióstratégiát lehessen kidolgozni.

2. Célkitűzések

Ugyan számos elmélet látott napvilágot, az OTA pontos hatásmechanizmusa jelenleg ismeretlen. Nem tudjuk, hogy a hosszú távú expozíció során mi az a hatás, illetve mik azok a hatások emberben, amelyek a legfontosabb jelentőséggel bírnak a toxin patomechanizmusában. Ahhoz, hogy az OTA által okozott negatív hatásokat ellensúlyozni tudjuk, a toxin viselkedésének mélyebb szintű megértése szükséges. Éppen ezért vizsgálataink során az alábbi célokat tűztük ki:

- Az OTA fizikai-kémiai viselkedésének pontosabb megismerése: interakciók vizsgálata ionokkal, fehérjékkel és egyéb endogén molekulákkal.
- Az OTA-albumin interakció kvantitatív vizsgálata, alacsony toxicitású potenciális kompetitor-molekulák azonosítása.
- OTA abszorpciójának csökkentésére vagy eliminációjának fokozására potenciálisan alkalmas molekulák keresése.
- OTA toxikus hatásainak vizsgálata *in vitro* sejtes modellben.
- OTA toxikodinámiai hatásainak ellensúlyozására alkalmazható molekulák keresése.

3. Vizsgálati módszerek

A fluoreszcens spektroszkópiai és fluoreszcencia polarizációs mérésekhez Hitachi F4500 fluoreszcens spektrofotométert, valamint Fluorolog $\tau 3$ típusú spektrofluorimetriás rendszert (Jobin-Yvon/SPEX) használtunk. A méréseket levegő jelenlétében, +25 °C-on (a termodinamikai vizsgálatok kivételével) végeztük.

Az OTA és az $\text{OTA}^{2-}\text{-Mg}^{2+}$ komplex kromatográfiás meghatározásához integrált HPLC-rendszert alkalmaztunk (Agilent 1100), amely kvaterner pumpából, gáztalanítóból, automata mintaadagolóból, injektorból, termosztálható oszloprekeszből és fluoreszcens detektorból áll. Az adatok rögzítéséhez és kiértékeléséhez Agilent ChemStation (Rev.B.03.02-SR2) programot használtunk. Az elválasztás LiChroCART® típusú oszlopon (4 mm × 125 mm, 5 μm -os pórusméret, Merck Purospher STAR® RP-18e) történt, előtét kolonna alkalmazása mellett (TR-C-160-K1; ABLE Jasco).

A lumineszcens ATP-meghatározás Berthold Lumat LB9507 luminométerrel történt. Az áramlási citometriás vizsgálatokhoz Beckman-Coulter FC500 típusú flow citométert alkalmaztunk, az adatok elemzése CXP szoftver felhasználásával történt. A ROS-méréshez Promega GloMax[®]-Multi Microplate Multimode Readert használtunk.

Az OTA hatásának vizsgálatát MDCK sejteken végeztük: (Madine, Darby canine kidney; ATCC: CCL 34; immortalizált, tubuláris vesesejtek). A sejtenyészetet DMEM típusú, magas glükóztartalmú (4,5 g/l) médiumban tartottuk fenn és inkubáltuk, ami 10% FBS-t, valamint penicillint (100 U/ml) és streptomocint (100 µg/ml) tartalmazott. A sejteket 25 cm²-es steril flaskákban (VWR) tartottuk fenn. A kísérleteket 96-lyukú steril lemezekben (VWR) végeztük az áramlási citometriás mérések kivételével, amelyekhez 6-lyukú steril lemezeket (VWR) használtunk. A sejtenyésztés és inkubálás 37 °C-on, 5% CO₂ jelenlétében történt. A steril munkákat egy Aireguard-126300 (Nuaire) típusú vertikális áramlású lamináris boxban végeztük.

A (marha szérumalbuminra vonatkoztatott) totál protein meghatározása fluorescamin, a lumineszcens ATP-meghatározás luciferin-luciferáz, az intracelluláris ROS-koncentráció megállapítása C400 reagenssel történt. A kezelt és kontroll sejtek életképességét calcein- és propidium-jodid – FITC-AnnexinV viabilitás tesztek felhasználásával értékeltük. A sejtciklus vizsgálatához a sejtek permeabilizálását követően propidium-jodidot használtunk.

A statisztikai analízist SPSS (IBM, Version 20) szoftverrel végeztük. Eredményeinket minden esetben legalább három, egymástól független mérésből számoltuk. A szignifikancia megállapításához one-way ANOVA típusú analízist használtunk ($p < 0,05$).

4. Eredmények, következtetések

4.1. Ochratoxin A interakciója szérumalbuminnal. Az Ochratoxin A vizes oldatban a pH-tól és a mikrokörnyezettől függően három különböző formában lehet jelen: nemionos, monoanion (OTA⁻) és dianion (OTA²⁻). Fiziológiás körülmények között egyértelműen a dianion forma dominál, ennek okai, hogy a 7,4-es pH meghaladja a toxin pKa-értékeit, továbbá az, hogy az alkálifémek meglehetősen magas koncentrációban vannak jelen. Az OTA⁻ a nemionos formával megegyező fluoreszcens sajátságokat mutat ($\lambda_{exc} = 332$ nm, $\lambda_{em} = 451$ nm). Ezzel szemben az OTA²⁻ gerjesztési és emissziós maximumai eltérnek a másik két formától ($\lambda_{exc} = 380$ nm és $\lambda_{em} = 443$ nm), és a dianion forma lényegesen magasabb fluoreszcens jelet is

ad. Az OTA kötődése albuminhoz a spektrum további módosulását eredményezi: az OTA²⁻-HSA komplex 393 és 446 nm gerjesztési és emissziós hullámhossz-maximumokkal jellemezhető és a kötődés a fluoreszcencia intenzitás növekedését eredményezi. Mivel az albuminkötődés az OTA toxikokinetikájában egy kulcsmomentum, érdeklődésünk egyik kiemelt tárgyát képezi. Az OTA-HSA komplex stabilitási állandóját háromféleképpen is meghatároztuk (fluoreszcencia intenzitás, fluoreszcencia polarizáció és kioltás alapján): mindhárom esetben hasonló, 10⁷ dm³/mol fölötti asszociációs konstanszt kaptunk. Ez az érték az albumin-ligand komplexek között kiemelkedően magas és magyarázatot ad a toxin extrém hosszú plazmafelezési idejére.

Az OTA a különböző albumin-specieszekhez rendkívül eltérő affinitással kötődik. Az OTA-albumin komplexek kötési állandóit PBS-ben (pH = 7,4) határoztuk meg humán (HSA), marha (BSA) és patkány szérumalbumin (RSA) esetében 25 °C-on. Az eredmények a következők: $\log K_{\text{OTA-HSA}} = 7,65 \pm 0,36$, $\log K_{\text{OTA-BSA}} = 6,48 \pm 0,22$ és $\log K_{\text{OTA-RSA}} = 6,17 \pm 0,12$ (ahol K a dm³/mol-ban kifejezett asszociációs konstans). Tehát a toxin a BSA-nál 15-ször, míg az RSA-nál 30-szor stabilabb komplexet képez HSA-val.

Ezt követően egy korábban publikált fluoreszcencia polarizáció (továbbiakban csak polarizáció) alapú modellt vettünk össze két fluoreszcencia intenzitás alapú értékeléssel. A három alkalmazott módszer által adott szinte megegyező eredmények igazolták, hogy képesek vagyunk az OTA-HSA interakció pontos, kvantitatív követésére. Így a későbbiekben a polarizáció alapú modell felhasználásával vizsgáltuk a kompetitív interakciókat gyógyszerekkel és flavonoidokkal.

4.2. OTA leszorítása albuminról gyógyszerekkel. Munkánk e részében azt tűztük ki célul, hogy az eddig ismerteken túl további olyan gyógyszer-molekulákat azonosítsunk, amelyek hatékony kompetitorok lehetnek OTA-val szemben. Vizsgálataink 13 gyógyszer-molekulára terjedtek ki, 1 μM OTA-t és szaturáció feletti HSA koncentrációt (1,7 μM) alkalmaztunk, a vizsgálatok PBS-ben (pH = 7,4) történtek, 40, 70 és 100 μM-os gyógyszer-koncentrációk felhasználásával. A vizsgált kompetitorok közül az acetilszalicilsav, nifedipine, phenobarbital, phenytoin, theophylline és verapamil nem mutatott kölcsönhatást az alkalmazott koncentrációkban. Ezzel szemben az ibuprofen, indometacin, furosemide, glipizide, phenylbutazone, simvastatin és warfarin hatékony kompetitornak bizonyult. Az indometacin és a phenylbutazone hatása volt a legmagasabb, őket a warfarin, furosemide és ibuprofen követi, végül a simvastatin és

glipizide esetében alacsonyabb, de még jelentősnek mondható leszorítást tapasztaltunk. Néhány közlemény beszámolt már a warfarin és egyes NSAID-ok (piroxikám, indometacin) kölcsönhatásairól OTA-val, de a furosemide, glipizide és simvastatin azonosítása, valamint a phenobarbital és acetilszalicilsav kizárása (mivel erről a két anyagról több esetben valószínűsítették már az esetleges leszorításos interakciót) mint kompetitorok új információt jelentenek. Véleményünk szerint érdemes lenne megvizsgálni, hogy az említett kompetitorok valamelyikét krónikusan alkalmazó páciensek körében változik-e és ha igen, akkor hogyan változik az endémiás nefropátia vagy a húgyúti tumorok előfordulása az endémiás zónákban.

4.3. OTA leszorítása albuminról flavonoid aglikonokkal. Az utóbbi években fény derült arra, hogy a flavonoidok jelentős mértékben képesek kötődni szérumalbuminhoz, a kötőhelyük pedig az OTA-éval megegyező (Sudlow's site I). Ez, valamint a tény, hogy a flavonoidok toxicitása meglehetősen alacsony, azaz nagyobb mennyiségben is alkalmazhatóak ismert mellékhatások nélkül, alkalmassá tehetik ezt a molekulacsoportot arra, hogy az OTA albuminról való leszorításával fokozzuk a toxin eliminációját. Kísérleteinkben 12 különböző szerkezetű flavonoid aglikont vizsgáltunk. A méréseket az előző pontban leírtaknak megfelelően végeztük el (4.2.), azzal a különbséggel, hogy a flavonoidokból 10, 25 valamint 50 μM -os végkoncentrációkat alkalmaztunk. A flavonok és a flavonolok hatékony kompetitorok, míg a flavanonok és a daidzein (izoflavon) szinte teljesen hatástalannak bizonyultak az alkalmazott koncentrációkban. Ez az eredmény arra utal, hogy a C2-C3 kettőskötés, valamint annak konjugációja a C4 karbonilcsoporttal kritikus a kölcsönhatás szempontjából. A daidzein annak ellenére, hogy tartalmazza az említett kettőskötést, nem képes leszorítani a toxint. Ennek szterikus okai lehetnek, mivel a nagy térkitöltésű fenilcsoport C3 pozícióban helyezkedik el az izoflavonoidok esetében. A vizsgált flavonoidok közül a galangin bizonyult magasan a leghatékonyabb kompetitorok, őt a quercetin követi. Mindkét származékban jelen van a C3 hidroxilcsoport, amelynek valószínűleg fontos szerepe van az interakcióban. Eredményeink rávilágítanak, hogy a kölcsönhatás szempontjából az a legkedvezőbb, ha a B-gyűrű egyáltalán nem tartalmaz szubsztituenset. Emellett a szubsztituensek száma és helyzete is fontos: a C3'- és C4'-helyzetű hidroxilcsoportokat tartalmazó quercetin esetében lényegesen magasabb leszorítást értünk el, mint a szintén flavonol morin és myricetin hatására.

Ennek oka a C2'- és C4'- helyzetű szubsztitúció (morin) valamint a C3'-, C4'- és C5'-helyzetű szubsztitúció (myricetin) lehet a B-gyűrűn, ahol az orto- és a két meta-helyzetű szubsztituens szterikus okok miatt gyengíti a kompetíciós képességet.

Vannak olyan állatkísérletes eredmények, amelyek az albuminról való leszorítás pozitív hatására utalnak, de jelenleg nincs erre döntő bizonyíték. Másrészt a magasabb szabad frakció feltehetőleg emelkedett metabolizmussal is jár. Nem tudhatjuk, hogy a detoxikáció (pl. 4-hidroxi-OTA és 10-hidroxi-OTA) mellett fog-e képződni nagyobb mennyiségben egyéb, magas toxicitású, reaktív metabolit is. Jelenleg azonban nem ismerünk olyan kutatást, amely egyértelműen azonosítaná a leszorítási interakció negatív hatását.

4.4. OTA interakciója alkálifémekkel és alkáliföldfémekkel. Mivel ebben a részben alkálifémek és alkáliföldfémek hatását vizsgáltuk, a legtöbb mérés esetében 0,1 M-os koncentrációjú TRIS-HCl (pH = 7,4) puffert használtunk. A kísérletekhez Li^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} és Ba^{2+} -ionok kloridsóit alkalmaztuk. Alkálifémek jelenlétében a toxin gerjesztési és emissziós maximumai nem változnak, azonban a dianion forma mennyiségének növekedését tapasztaltuk. A hatás erősségét $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ \sim \text{K}^+$ sorrenddel jellemezhetjük. Ezzel szemben az alkáliföldfémek esetében a spektrumok lényeges változását tapasztaltuk, mind hullámhossz, mind intenzitások tekintetében. Magnéziumionnál 375 és 427 nm-t, kalciumionnál 375 és 433 nm-t, míg báriumionnál 377 és 439 nm-t állapítottunk meg, mint gerjesztési és emissziós maximumokat. Eredményeink arra utalnak, hogy a vizsgált ionok esetében az OTA^{2-} a preferált forma. Ezt követően Hyperquad2006 (Protonic Software) program felhasználásával határoztuk meg a stabilitási állandókat. A $\log K$ -értékek a következők szerint alakultak: $\text{OTA-Mg}^{2+} = 3,40 \pm 0,01$, $\text{OTA-Ca}^{2+} = 2,78 \pm 0,01$, $\text{OTA-Ba}^{2+} = 1,92 \pm 0,02$. A magnéziumion 4-szer stabilabb komplexet képez OTA-val, mint a kalciumion, továbbá 30-szor stabilabbat, mint a báriumion. Termodinamikai számításaink (a van't Hoff – egyenlet alapján) arra utalnak, hogy a komplexképződés entrópia által vezérelt folyamat, amit feltehetően főként az alkáliföldfém-ionok hidrátburkának elvesztése eredményez. Az $\text{OTA}^{2-}\text{-Mg}^{2+}$ interakció PBS-ben történő vizsgálata arra utal, hogy az OTA-hoz viszonyítva kb. 15.000-szeres Mg^{2+} -koncentrációra van szükség ahhoz, hogy a toxin teljes mennyiségét kötésbe vigyük. Ezek alapján valószínűsíthető, hogy a toxin

nem fehérjekötött frakciójának nagy része magnézium-komplexben van jelen a szervezetben.

4.5. OTA²⁻-Mg²⁺ interakció alkalmazása HPLC-FLD rendszeren. Mivel az OTA²⁻-Mg²⁺ komplex viszonylag stabil, valamint az interakció az OTA fluoreszcenciájának jelentős mértékű növekedésével jár, felmerült bennünk a gondolat, hogy a kölcsönhatást analitikai módszerek érzékenyítésére is fel lehetne használni. Ennek igazolása érdekében HPLC-FLD műszeren teszteltük feltételezésünket. Az alkalmazott alkalikus mozgófázis esetében [trietilamin puffer (trietilamin-hidroklorid/trietilamin, 5 mM, pH = 9.8) – acetonitril: 0-10 percig az ACN-t lineárisan 17,5%-ról (v/v) 25,0%-ra (v/v) növeltük, míg a trietilamin puffert 82,5%-ról (v/v) 75%-ra (v/v) csökkentettük, majd 10-12 perc között visszaálltunk a kezdeti állapotra], 5 mM MgCl₂ hozzáadása az eluens pufferkomponenséhez kétszeresére növeli a módszer érzékenységét. A Mg²⁺ alkalmazása alkalikus eluensekben azért lehet nagy jelentőségű, mert duplájára emelhetjük a detektálás érzékenységét, anélkül, hogy az eljárás költségei emelkednének, emellett a módszer a mintaelőkészítést sem befolyásolja.

4.6. OTA interakciója cink(II)-ionokkal. Más kétértékű kationok esetleges kölcsönhatásait is vizsgáltuk az OTA-val: cink(II)-ionok esetében jelentősnek mondható kölcsönhatásra bukkantunk. Ebben az esetben is a gerjesztési és emissziós hullámhossz-maximumok változását ($\lambda_{\text{exc}} = 370$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 431$ nm), a fluoreszcens jel növekedését, valamint az OTA²⁻ iránti preferenciát figyeltük meg. Az OTA²⁻-Zn²⁺ komplex esetében $\log K = 3,78 (\pm 0,02)$ értéket határoztunk meg 25 °C-on 0,1 M TRIS-HCl pufferben (pH = 7,4). Ez az OTA²⁻-Mg²⁺ komplex stabilitási állandójának csaknem 2,5-szerese. Mivel az utóbbi években megjelent közlemények rámutattak, hogy Zn²⁺-szupplementációval az OTA negatív hatásai ellensúlyozhatók, elképzelhető, hogy a direkt OTA-cink interakciónak van biológiai szerepe.

4.7. OTA interakciója ciklodextrinekkel. Néhány korábbi publikáció beszámol az OTA interakciójáról β - és γ -ciklodextrinekkel. A komplexek stabilitása azonban elég alacsony és az interakció sok esetben nem, vagy csak minimális fluoreszcencia-változással jár. Többféle kémiaileg módosított β -ciklodextrint (β -CD) teszteltünk annak érdekében, hogy a korábbiakban leírt származékokhoz viszonyítva stabilabb komplexet tudjunk képezni OTA-val, továbbá az OTA dianion formája iránt mutatott magasabb preferencia elérése is céljaink között szerepelt. Egyértelműen a QABCD ([2-hidroxi-3-N,N,N-trimetilamino]-propil- β -ciklodextrin-klorid) bizonyult a legeredményesebb származéknak. A toxin inklúziója a QABCD

által nem eredményez eltérést annak fluoreszcenciájában, azonban a ciklodextrinek mérete elég nagy ahhoz, hogy kötődés esetén lényegesen megemeljék az OTA fluoreszcencia polarizációját. Eredményeink alapján az OTA²⁻ 200-szor stabilabb komplexet képez QABCD-nel mint a natív β -CD-nel. A komplexstabilitás jelentős fokozódását az okozza, hogy QABCD esetében az OTA inklúzióját ionos interakcióval erősítjük. Emellett a QABCD 130-szor stabilabb komplexet képez a toxin dianion formájával, a monoanionhoz viszonyítva. Továbbá az OTA²⁻-QABCD interakcióra meghatározott 4,46-os ($\pm 0,09$) logK-érték kb. 10-szer nagyobb stabilitást jelez, mint amit az eddigiekben publikált legstabilabb OTA-CD komplex esetében megállapítottak. Megfelelő szerkezetű ciklodextrinek alkalmazásával feltehetőleg gátolni tudnánk az OTA felszívódását vagy akár fokozni a szervezetből történő kiürülését.

4.8. OTA hatásai MDCK sejteken. Az MDCK sejteket 0-15 μ M közötti OTA-koncentrációkkal kezeltük 24 órán keresztül. OTA hatására a celluláris paraméterek dóziszfüggő, szignifikáns változását figyeltük meg: a fehérje- és az ATP-koncentráció, valamint a calcein által adott fluoreszcens jel egyaránt csökkent. A calcein-értékek lineárisan korreláltak az inkubálás lejárta követően Bürker-kamrával meghatározott sejtszámokkal. Méréseink alapján az összfehérje-koncentráció a sejtszámmal hasonló mértékben változik. Így az általunk alkalmazott kísérleti modellben jelentős mértékben csökken az élő sejtek száma a kontrollhoz képest, azonban a fehérjeszintézis-gátló hatás nem túl kifejezett. Ezzel szemben a proteinre vonatkoztatott ATP-szint szignifikáns mértékben csökken, továbbá a ROS/fehérje-arány jelentős emelkedése is megfigyelhető. A propidium-jodid – FITC-AnnexinV próba alapján ugyan az apoptotikus sejtek száma nő OTA kezelés hatására, jelentős emelkedés csak extrém koncentrációk esetében tapasztalható. Ezzel szemben az OTA sejtciklusra gyakorolt negatív hatását már 5 μ M OTA esetében is tapasztaltuk: a G2/M-fázis koncentráció-függő emelkedését figyeltük meg, miközben a G0/G1-fázisú sejtek száma csökken, valamint az S-fázisúak száma gyakorlatilag változatlan.

4.9. Diosmetin hatása OTA-val kezelt sejteken. Számos vegyületet teszteltünk, annak érdekében, hogy egy olyan anyagra leljünk, amivel ellensúlyozhatóak az OTA MDCK sejtekre gyakorolt negatív hatásai. A diosmetin (DIOS) nevű flavonoid-aglikon esetében meglepő hatást tapasztaltunk. Az anyag már önmagában adva is 6 és 12 órás inkubációkat követően szignifikánsan emelte az intracelluláris ATP-szintet a kezelt

sejtekben, majd 24 órát követően az ATP-koncentráció visszatért a kontroll szintjére. Lumineszcens eredményeinket HPLC-UV módszerrel végzett méréseink is megerősítették. A calcein esszé és az összfehérje meghatározása igazolta, hogy eközben az élő sejtek száma változatlan a kontrollhoz viszonyítva. A DIOS hatásmechanizmusának megértése céljából különböző gátlószereket alkalmaztunk: nátrium-fluoridot (glikolízis gátlása), 3-bromopiruvátot (glikolízis és piruvát-dehidrogenáz gátlása), valamint oligomicin A-t (ATP-szintáz gátlása). Érdekes módon a NaF és a 3-bromopiruvát nem volt képes felfüggeszteni a DIOS által eredményezett ATP-emelkedést, azonban oligomicin A adására a hatás teljesen megszűnt. A DIOS pontos hatásmechanizmusának feltárásához azonban további vizsgálatokra van szükség.

Ezt követően a DIOS hatását OTA-kezelt sejteken teszteltük. MDCK sejtek esetében az OTA 24 óra alatt fejt ki jelentős hatást alacsonyabb koncentrációkban (5-15 μM), míg a DIOS kedvező hatása 6-12 órás kezelést követően mutatkozik meg. Ebből kifolyólag az MDCK sejteket 12 órán keresztül inkubáltuk 15 μM OTA-t tartalmazó médiumban, majd a médium lecserelése nélkül hozzáadtunk DIOS-t úgy, hogy a végkoncentrációk 5, 10 és 15 μM legyenek. Ezt a lépést további 12 óra inkubáció követte. Mindhárom DIOS-koncentráció szignifikánsan emelte az intracelluláris ATP-szinteket az OTA-val kezelt sejtekben. 15 μM DIOS esetében teljes mértékben sikerült visszaállítani a sejtek ATP-tartalmát a kontroll szintjére. Emellett a ROS-szinteket is meghatároztuk a sejtekben: a DIOS önmagában és OTA-val együttesen kezelt sejtek esetében is szignifikánsan, de csak kis mértékben csökkentette a ROS-koncentrációt. Azonban az OTA sejtciklusra gyakorolt negatív hatását nem tudtuk diosmetinnel ellensúlyozni.

5. Új megállapítások

- Igazoltuk a korábban publikált fluoreszcencia polarizációs technikán alapuló módszer alkalmazhatóságát OTA-HSA kölcsönhatás esetében.
- Azonos modellben megállapítottuk az OTA humán, marha és patkány szérumalbuminnal képezett komplexeinek stabilitási állandóját.
- Leírtuk, hogy a furosemide, glipizide és simvastatin képes az OTA-t leszorítani HSA-ról, valamint azt, hogy a phenobarbital és acetilszalicilsav (ellentétben a korábbi elképzelésekkel) nem tartozik a hatékony kompetitorok közé.
- Kimutattuk, valamint kémiaiilag és kvantitatíve jellemeztük egyes flavonoid aglikonok kompetíciós képességét OTA-val szemben a HSA-hoz való kötődésért.
- Igazoltuk, jellemeztük az OTA interakcióját alkálifém-, alkáliföldfém-, valamint cink(II)-ionokkal. Az $OTA^{2-}-Mg^{2+}$ komplex képződésekor történő fluoreszcencia növekedés elvén alapuló új, magasabb érzékenyséű kromatográfiás eljárást dolgoztunk ki HPLC-FLD módszerre.
- A korábban publikált OTA-CD komplexeknél lényegesen stabilabb interakciót találtunk az OTA-QABCD esetében. Emellett a QABCD erős preferenciát mutat a dianion forma iránt, eltérően a korábban leírt származékoktól.
- Rámutattunk, hogy MDCK sejtek esetében az OTA fő toxikus hatása a G2-fázis blokádjá, amit antioxidánsokkal nem tudunk sikerrel ellensúlyozni.
- Kimutattuk a diosmetin ATP-rendszerre gyakorolt pozitív hatását, és sikerrel használtuk föl az interakciót az OTA által indukált ATP-depléció visszafordítására.

6. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Kőszegi Tamás egyetemi docensnek az útmutatásért és állandó fáradhatatlan munkájáért, segítőkészségéért. Köszönettel tartozom Prof. Dr. Kovács L. Gábornak és Prof. Dr. Miseta Attilának, a Laboratóriumi Medicina Intézet előző és jelenlegi vezetőinek, akik lehetővé tették, hogy munkámat intézetükben végezzem és mindig támogattak. Emellett kiemelt köszönettel tartozom Dr. Kunsági-Máté Sándornak, az Általános és Fizikai Kémia Tanszék vezetőjének a molekuláris kölcsönhatások vizsgálatában nyújtott segítségéért, szakmai tanácsaiért. Köszönetet mondok Dr. Matisz Gergelynek a kémiai számításokban és molekulamodellezésben, Yin Li-nek a termodinamikai számításokban, valamint Dr. Kuzma Mónikának és Dr. Montskó Gergelynek a kromatográfiás mérésekben nyújtott segítségükért. Továbbá köszönettel tartozom a Laboratóriumi Medicina Intézet, az Általános és Fizikai Kémia Tanszék és a Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet munkatársainak, akik közreműködtek és/vagy segítettek munkámat, valamint az összes kooperációs partnerünknek. Végül köszönettel tartozom családomnak és kedvesemnek, akik támogatása nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre.

7. Saját közlemények listája

7.1. Jelen PhD dolgozat alapjául szolgáló közlemények

Poór M, Kunsági-Máté S, Bencsik T, Petrik J, Vladimir-Knežević S, Kőszegi T, Flavonoid aglycones can compete with Ochratoxin A for human serum albumin: A new possible mode of action. *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES* 51 (2012) 279-283. [IF: 2,596]

Poór M, Kunsági-Máté S, Czibulya Z, Li Y, Peles-Lemli B, Petrik J, Vladimir-Knežević S, Kőszegi T, Fluorescence spectroscopic investigation of competitive interactions between ochratoxin A and 13 drug molecules for binding to human serum albumin. *LUMINESCENCE* 28 (2013) 726-733. [IF: 1,273]

Poór M, Kunsági-Máté S, Matisz G, Li Y, Czibulya Z, Peles-Lemli B, Kőszegi T, Interaction of alkali and alkaline earth ions with Ochratoxin A. *JOURNAL OF LUMINESCENCE* 135 (2013) 276-280. [IF: 2,144]

Poór M, Li Y, Matisz G, Kiss L, Kunsági-Máté S, Kőszegi T, Quantitation of species differences in albumin-ligand interactions for bovine, human and rat serum albumins using fluorescence spectroscopy: A test case with some Sudlow's site I ligands. *JOURNAL OF LUMINESCENCE* 145 (2014) 767-773. [IF: 2,144]

Poór M, Veres B, Jakus PB, Antus C, Montskó G, Zrínyi Z, Vladimir-Knežević S, Petrik J, Kőszegi T, Flavonoid diosmetin increases ATP levels in kidney cells and relieves ATP depleting effect of ochratoxin A. *JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY B: BIOLOGY* 132 (2014) 1-9. [IF: 3,110]

Poór M, Kuzma M, Matisz G, Li Y, Perjési P, Kunsági-Máté S, Kőszegi T, Further aspects of ochratoxin A – cation interactions: complex formation with zinc ions and a novel analytical application of ochratoxin A – magnesium interaction in the HPLC-FLD system. *TOXINS (BASEL)* 6 (2014) 1295-1307. [IF: 2,129]

Li Y, Czibulya Z, **Poór M**, Lecomte S, Kiss L, Harte E, Kőszegi T, Kunsági-Máté S, Thermodynamic study of the effects of ethanol on the interaction of ochratoxin A with human serum albumin. *JOURNAL OF LUMINESCENCE* 148 (2014) 18-25. [IF: 2,144]

7.2. Jelen PhD dolgozat alapjául szolgáló előadások és poszterek

Poór M, Kőszegi T, Kunsági-Máté S, Competitive Interaction between Flavonoid Aglycons and Ochratoxin A During their Binding to Human Serum Albumin. *The Third Asian Spectroscopy Conference* (Xiamen, Kína, 2011.11.28-2012.12.01.) [poszter]

Poór M, Kőszegi T, Li Y, Czibulya Z, Kunsági-Máté S, Investigation of competitive interaction between Ochratoxin A and drug molecules for serum albumin. *10th Conference of Colloid Chemistry* (Budapest, Magyarország, 2012.08.29-2012.08.31.) [poszter]

Poór M, Li Y, Matisz G, Kőszegi T, Kunsági-Máté S, Interaction of Ochratoxin A with alkaline earth ions. *1st Symposium on Weak Molecular Interactions* (Pécs, Magyarország, 2013.03.05-2013.03.06.) [előadás]

7.3. Egyéb közlemények

Poór M, Li Y, Kunsági-Máté S, Petrik J, Vladimir-Knežević S, Kőszegi T, Molecular displacement of warfarin from human serum albumin by flavonoid aglycones. *JOURNAL OF LUMINESCENCE* 142 (2013) 122-127. [IF: 2,144]

Poór M, Li Y, Kunsági-Máté S, Varga Z, Hunyadi A, Dankó B, Chang FR, Wu YC, Kőszegi T, Protoapigenone derivatives: albumin binding properties and effects on HepG2 cells. *JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY B: BIOLOGY* 124 (2013) 20-26. [IF: 3,110]

7.4. Egyéb előadások és poszterek

Poór M, Kunsági-Máté S, Li Y, Kőszegi T, A new possible mechanism of flavonoid-drug interaction: flavonoids are able to displace warfarin from human serum albumin. *20th IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (Milano, Olaszország, 2013.05.19-2013.05.23) [poszter]