

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

**Zearalenon és metabolitjainak kölcsönhatásai szérumban  
albuminnal és ciklodextrinekkel**



**Dr. Faisal Anna Zelma**

**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

A zearalenon (ZEN) *Fusarium* penészgombák másodlagos anyagcseretermékeként képződő, xenoösztrógen hatású mikotoxin, mely főként gabonafélékben (pl. kukorica) és belőlük előállított takarmányokban, élelmiszerekben és italokban előforduló szennyező. Orális expozícióját követően gyorsan felszívódik, majd fázis I biotranszformációja során  $3\alpha/\beta$ -hidroxiszteroid-dehidrogenáz által katalizált reakcióval  $\alpha$ - és  $\beta$ -zearalenolokká ( $\alpha$ - és  $\beta$ -ZEL) redukálódik. További redukációs folyamatok során zearalanon (ZAN), valamint  $\alpha$ - és  $\beta$ -zearalanol ( $\alpha$ - és  $\beta$ -ZAL) metabolitok képződnek. A ZEN fázis II metabolizmusa jellemzően szulfát (pl. zearalenon-14-szulfát: Z14S) és glükuronid konjugációkat eredményez. A redukált metabolitok az anyavegyülettel közel azonos vagy akár erősebb (pl.  $\alpha$ -ZEL és  $\alpha$ -ZAL) xenoösztrógen hatásokkal rendelkeznek. A ZEN metabolizmusa már a fonalas gombákban megkezdődhet, ami során a módosított mikotoxinok (pl. Z14S) csoportjába tartozó metabolitok keletkeznek. Emellett a mikotoxinok metabolizmusa a növényekben (jellemzően védekező mechanizmusok során) is végbemegy, így ún. „maszkolt mikotoxinok” (pl. zearalenon-14-glükozid: Z14G) képződnek, melyek analitikai detektálása nehézkes, főleg az analitikai standardok hiányából adódóan. Bár a konjugált metabolitok toxicitása jóval alacsonyabb az anyavegyületénél, de a redukált származékokhoz és a ZEN-hoz hasonlóan megjelennek takarmányokban és egyes élelmiszerekben, majd a gasztrointesztinális traktusban ZEN-ná alakulnak, ezáltal az expozíciójukhoz kapcsolódó kockázatot az anyavegyületéhez hasonlóan tekintik.

Az albumin a keringésben domináns plazmafehérje, a vér onkotikus nyomásának fenntartásán túl pseudo-enzimatikus és puffer kapacitással is rendelkezik. Emellett képes endogén és exogén molekulák (pl. gyógyszerek, toxinok) megkötésére. A kölcsönhatás során kialakuló komplexek stabilitása befolyásolhatja a kötődő molekulák szöveti disztribúcióját és eliminációjuk sebességét. A humán szérumban albumin (HSA) két legfontosabb kötőhelye a IIA aldoménon elhelyezkedő Sudlow's site I és a IIIA aldoménon megtalálható Sudlow's site II. A marha (BSA), sertés (PSA) és patkány szérumban albumin (RSA) nagy szerkezeti hasonlóságot mutat (73-76% szekvencia azonosság) a HSA-nal. A szérumban albumin fluoreszcens tulajdonságáért főként a triptofán (Trp) aminosav felelős (pl. Trp-214 a HSA és RSA esetében).

A ciklodextrinek (CD) a gyógyszer-, élelmiszer- és kozmetikai-iparban is gyakran alkalmazott, glükóz egységekből felépülő, gyűrű alakú molekulák. Belső lipofil üregüknek köszönhetően gazda-vendég típusú zárványkomplexek kialakítására képesek apoláros molekulákkal (többek között egyes mikotoxinokkal is), míg külső hidrofil részük kiváló vízoldhatóságot biztosít. A fluoreszcens tulajdonságú mikotoxinokkal történő komplexképződés jellemzően a vendégmolekulák emissziós jelének jelentős emelkedésével jár, így a CD technológia alkalmas lehet a mikotoxinok analitikai detektálásának érzékenyítésére. Emellett a vízben nem oldódó felülethez kapcsolt CD polimerek ígéretes mikotoxin kötőnek tűnnek vizes oldatok toxinmentesítésére.

## 2. Célkitűzések

A ZEN metabolitok albuminkötődése és CD-ekkel kialakított kölcsönhatásaik kapcsán csak kevés információ állt rendelkezésre, ezért munkám során a következő aspektusok vizsgálatát tűztem ki célul:

- ZEN,  $\alpha$ -ZEL,  $\beta$ -ZEL, ZAN,  $\alpha$ -ZAL,  $\beta$ -ZAL, Z14G és Z14S szérum albuminnal kialakított kölcsönhatásainak vizsgálata, a mikotoxinok toxikokinetikai tulajdonságainak mélyebb szintű megismerése és megértése céljából. Elsősorban a képződő komplexek stabilitásának meghatározását terveztem, különös tekintettel a különböző fajokból származó (humán, marha, sertés és patkány) albuminokkal kialakított interakciójukra, az esetleges faji eltérések feltárására érdekében.
- A HSA-on nem konvencionális kötőhellyel rendelkező ZEN, valamint a metabolitok ( $\alpha$ -ZEL,  $\beta$ -ZEL, ZAN,  $\alpha$ -ZAL,  $\beta$ -ZAL, Z14G és Z14S) hatásainak vizsgálata a Site I marker warfarin albuminkötődésére.
- Maszkolt (Z14G) és módosított (Z14S) mikotoxinok kölcsönhatásainak vizsgálata natív és kémiaailag módosított CD-ekkel, melynek során a képződő komplexek stabilitására és a CD-ek által indukált fluoreszcencia erősítésre voltam kíváncsi.
- A  $\beta$ -CD gyöngypolimer extrakciós hatékonyságának vizsgálata ZEN és metabolitjai esetében, melynek analitikai mintadúsítás, valamint egyes vizes oldatok (pl. szennyezett italok) mikotoxinmentesítése kapcsán lehet jelentősége.

## 3. Vizsgálati módszerek

A mikotoxin-albumin és mikotoxin-CD kölcsönhatások fluoreszcencia spektroszkópiai vizsgálatait Hitachi F-4500 típusú fluoriméterrel végeztük, valamint Specord Plus 210 vagy Jasco-V730 típusú fotométer segítségével felvettük a ligandumok UV-Vis spektrumait. A méréseinket szobahőmérsékleten végeztük. A fluoreszcencia spektroszkópiai vizsgálatok során a mért intenzitásokat az abszorbancia adatok alapján korrigáltuk (a belső szűrő effektusból eredő hibák elkerülése érdekében).

A mikotoxin-albumin komplexek tanulmányozása fluoreszcencia kioltás típusú mérések alapján történt, fiziológiás pufferben (phosphate-buffered saline: PBS, pH 7,4;  $\lambda_{ex} = 295$  nm,  $\lambda_{em} = 340$  nm). A képződő komplexek stabilitását a Stern-Volmer egyenlet grafikus alkalmazásával és a Hyperquad2006 szoftver segítségével határoztuk meg. A ZEN és metabolitjainak albuminkötődése kapcsán a faji eltéréseket HSA, BSA, PSA és RSA fehérjékkel teszteltük. Emellett a mikotoxin-HSA kölcsönhatásokat nagyhatékonyságú affinitáskromatográfiával (HPAC) is megvizsgáltuk.

A mikotoxinok warfarin-HSA kölcsönhatásra gyakorolt hatásainak tanulmányozása során a site I marker warfarin fluoreszcens jelét vizsgáltuk HSA és emelkedő mikotoxin koncentrációk jelenlétében ( $\lambda_{ex} = 317$  nm,  $\lambda_{em} = 379$  nm; PBS, pH 7,4). Mivel az albumin-kötött warfarin fluoreszcens jele sokkal magasabb a szabad warfarinéhoz képest, a 379 nm-en mért fluoreszcencia intenzitás változása tájékoztatást ad a warfarin albuminkötődésének mértékéről.

A Z14G és Z14S natív és kémiaailag módosított CD-ekkel kialakított kölcsönhatásának tanulmányozása során standard mennyiségű mikotoxinhoz emelkedő CD koncentrációkat adtunk, majd a mikotoxinok fluoreszcenciájának változását követtük különböző pufferekben (Z14G: pH 3,0-10,0; Z14S: pH 5,0-10,0). A mikotoxin-CD komplexek kötési állandóit ( $K$ ; L/mol) a Benesi-Hildebrand egyenlet grafikus alkalmazásával határoztuk meg.

A ZEN és metabolitjainak vizes oldatokból és pufferekből történő extrakciójának vizsgálata során a mintákat termomixerben inkubáltuk  $\beta$ -CD gyöngypolimerrel (BBP), majd pulzus centrifugálást követően a felülúszó mikotoxin tartalmát HPLC-FLD módszerrel határoztuk meg. Ezt követően a BBP mikotoxinkötő képességét a Langmuir és Freundlich szorpciós izotermák segítségével is értékeltük. A ZEN kukoricasörből történő megkötését is megvizsgáltuk: a mikotoxinnal spike-olt minták inkubációját követően a felülúszóban visszamaradó mikotoxin mennyiségét (kétlépéses diklórmétános extrakciót és vákuumbepárlást követően) HPLC-FLD módszerrel határoztuk meg. Emellett a kukoricasör BBP által okozott szín- és polifenol tartalom változását is teszteltük. A BBP újra felhasználhatóságának vizsgálata során, a mikotoxin kötést követően a polimert 50 v/v% etanol-víz eleggyel, két lépésben regeneráltuk.

## 4. Eredmények és következtetések

### 4.1. Zearalenon és metabolitjainak kölcsönhatásai szérumban albuminnal

#### 4.1.1. Fluoreszcencia kioltás alapú vizsgálatok és a mikotoxin-albumin komplexek kötési állandóinak meghatározása

A fluoreszcencia kioltás típusú vizsgálatokból származó intenzitás értékek alapján a ZEN,  $\alpha$ -ZEL,  $\beta$ -ZEL, ZAN,  $\alpha$ -ZAL,  $\beta$ -ZAL és Z14S koncentrációfüggő módon csökkentették a HSA, BSA, PSA és RSA 340 nm-en detektált fluoreszcens jelét. Ez az intenzitás csökkenés az albumin fluoreszcenciájáért főként felelős triptofán jelének részleges kioltásából adódhat, ami mikotoxin-albumin komplexek képződésére utal. A Z14G nem befolyásolta az albumin fluoreszcenciáját, így a Z14G nem vagy csak nagyon kis affinitással kötődik szérumban albuminhoz. A mikotoxin-albumin komplexek Stern-Volmer kioltási konstansai ( $K_{SV}$ , L/mol) és a Hyperquad2006 szoftverrel meghatározott kötési állandók ( $K$ , L/mol) jó egyezést mutattak. A mikotoxin-albumin komplexek kötési állandói  $10^4$ - $10^5$  L/mol-os tartományban mozogtak. Jellemzően a Z14S kötődött a legnagyobb affinitással a különböző albuminokhoz (kivéve HSA), míg a  $\beta$ -ZEL és/vagy  $\beta$ -ZAL képezték a legalacsonyabb stabilitású komplexeket HSA, BSA és PSA-nal. A ZEN nem-konvencionális kötőhelyet foglal el a HSA-on a IIA és IIIA aldomének között. Molekulamodell alapján az  $\alpha$ -ZEL hasonló módon kötődik, míg a  $\beta$ -ZEL kötőhelye és/vagy kötési pozíciója eltér az anyavegyületétől, ami magyarázatul szolgálhat lényegesen alacsonyabb kötési affinitására.

Fontos kiemelni, hogy akár nagyságrendi eltérések is tapasztalhatók a ZEN és metabolitjainak albuminkötődésében a különböző fajok albuminjai esetében. Az anyavegyületnél tapasztaltuk a legkisebb (kb. 7-szeres eltérés RSA vs. PSA), míg  $\beta$ -ZAL esetében a legnagyobb eltérést (kb. 30-szoros különbség RSA vs. BSA). Az anyavegyület és a redukált származékok a PSA és/vagy BSA-hoz kötődtek a legalacsonyabb affinitással, míg a Z14S a HSA-hoz. A mikotoxinok minden esetben a RSA-nal alakították ki a legstabilabb komplexeket. A HSA, BSA, PSA és RSA aminosavsorrendje nagy hasonlóságot mutat, azonban a ZEN kötéséért felelős, nem-konvencionális kötőhelyen eltérő aminosavak találhatóak a RSA-ban. Ez a szerkezeti eltérés megmagyarázhatja a ZEN és metabolitjainak RSA kapcsán mutatott erősebb kötődését.

#### 4.1.2. Nagyhatékonyságú affinitáskromatográfiás mérések

Az HSA-nal immobilizált HPAC oszloppal végzett vizsgálataink során a mikotoxinok a HSA iránti affinitásuk alapján eluálódnak az oszlopról, tehát a nagy affinitással rendelkező vegyületek retenciós ideje hosszabb. A ZEN és redukált metabolitjainak retenciós ideje hasonló módon változott, mint az a fluoreszcencia kioltási kísérleteink alapján várható volt. A Z14G eluálódott a leghamarabb az oszlopról, ami nagyon gyenge Z14G-HSA kölcsönhatásra utal, majd ezt a  $\beta$ -ZAL,  $\beta$ -ZEL,  $\alpha$ -ZAL,  $\alpha$ -ZEL, ZAN, ZEN és a Z14S követték. Érdekes módon a Z14S a ZEN-nél hosszabb retenciós idővel eluálódott az oszlopról, pedig spektroszkópiai méréseink alapján a Z14S alacsonyabb affinitással kötődik HSA-hoz. A spektroszkópiai és HPAC eredményeinkben megfigyelt eltéréseket az eltérő kísérleti körülmények magyarázhatják, hiszen a spektroszkópiai vizsgálatokat PBS-ben (pH 7,4) végeztük, míg HPAC méréseink során (a gyártó ajánlásának megfelelően) az eluens szerves oldószert (izopropanol) és alacsony ionerősségű puffert (pH 7,0) tartalmazott.

#### 4.1.3. Zearalenon és metabolitjainak hatásai a warfarin-HSA kölcsönhatásra

A HSA egyes kötőhelyei között allosztérikus kapcsolat áll fenn. Többek között a ZEN kötőhelyeként azonosított IIA és IIIA aldomének közötti régió és a Sudlow's site I kötőhely között is kialakulhatnak ilyen kölcsönhatások. A ZEN-hoz hasonlóan a ZAN,  $\alpha$ -ZAL és  $\alpha$ -ZEL jelenlétében a site I markerként ismert warfarin HSA-nal kialakított komplexének fluoreszcenciája jelentősen megemelkedett. Az intenzitás emelkedés arra enged következtetni, hogy ezek a mikotoxinok növelik a HSA warfarin iránti affinitását (ezt a ZEN esetében ultraszűrési vizsgálatok is igazolták). Ezzel szemben a Z14G, Z14S és  $\beta$ -ZAL nem befolyásolták számottevően a warfarin-HSA komplexek fluoreszcenciáját, míg a  $\beta$ -ZEL kismértékben csökkentette a warfarin-HSA komplexek emissziós jelét. E megfigyelések szintén allosztérikus kölcsönhatásra utalnak a mikotoxinok és a warfarin kötőhelyei között.

Eredményeink alapján a ZEN és a ZEN metabolitok albuminkötődésének akár nagy toxikokinetikai jelentősége is lehet, tekintve, hogy a nemrég közölt toxikokinetikai állatkísérletek alapján az albumin iránti affinitásuk nagyon jól korrelál az eliminációjuk sebességével.

### 4.2. Zearalenon és metabolitjainak kölcsönhatásai ciklodextrinekkel

#### 4.2.1. Zearalenon-14-glükozid kölcsönhatása natív és kémiaiilag módosított ciklodextrinekkel

A Z14G fluoreszcens spektruma két gerjesztési csúcsot mutat 275 és 315 nm körül, az anyavegyülethez és a ZEL-okhoz hasonlóan. A Z14G emissziós spektrumai hasonlóak voltak pH 3,0-7,4 között, azonban a pH emelésével (pH 10,0) a fluoreszcens spektrumokban jelentős változás figyelhető meg: fluoreszcencia intenzitás csökkenést, valamint a Z14G emissziós maximumának kékeltolódását tapasztaltuk. A spektrumokban észlelt eltérések a Z14G fenolos hidroxilcsoportjának lúgos közegben történő deprotonálódásával magyarázhatók.

A Z14G fluoreszcencia intenzitásának jelentős emelkedését figyeltük meg natív  $\beta$ -CD (BCD) és  $\gamma$ -CD (GCD) jelenlétében, emellett a Z14G emissziós maximumának enyhe kékeltolódását ( $\lambda_{em} = 465 \text{ nm} \rightarrow 455 \text{ nm}$ ) tapasztaltuk CD-ek jelenlétében. Tekintve, hogy az alkalmazott körülmények között a vizsgált CD-ek nem mutattak fluoreszcenciát, megfigyeléseink Z14G-CD komplexek kialakulására utalnak. A Z14G fluoreszcenciájának nagyobb mértékű fokozódását tapasztaltuk BCD jelenlétében, mint GCD esetében.

Az eltérő pH-kon (pH 3,0-10,0) vizsgált Z14G-CD kölcsönhatások során pH 3,0-7,4 között hasonló tendenciát figyeltünk meg a CD-indukálta fluoreszcencia intenzitás emelkedésben. Ezzel szemben pH 10-en alacsonyabb fluoreszcencia intenzitás fokozódást tapasztaltunk a natív

és kémiaailag módosított CD-ek jelenlétében, és a mikotoxin emissziós maximumának enyhe vöröseltolódását ( $\lambda_{em} = 450 \text{ nm} \rightarrow 455 \text{ nm}$ ) figyeltük meg. A kisebb mértékű fluoreszcencia emelkedés a mikotoxin lúgos közegben bekövetkező deprotonálódásával magyarázható, ami arra utal, hogy a CD-ek a kölcsönhatás kialakítása során a mikotoxin nem-ionizált formáját preferálják. Ezt az is alátámasztja, hogy CD-ek jelenlétében az emissziós maximum az alacsonyabb pH-kon megfigyelt hullámhossz maximumra tolódik ( $\lambda_{em} = 455 \text{ nm}$ ).

A kémiaailag módosított  $\beta$ -CD származékok jelenléte nem eredményezett jobb fluoreszcencia intenzitás emelő hatást pH 3,0-7,4 között, mint a natív BCD. Azonban, lúgos közegben (pH 10,0) a random metilált  $\beta$ -CD (RAMEB) rendelkezett a legnagyobb fluoreszcencia erősítő hatással a vizsgált  $\beta$ -CD-ek között. Ezzel szemben, a GCD hidroxipropil (HPGCD) és random metilált (RAMEG) származékai erősebb fluoreszcencia intenzitás fokozó hatással rendelkeztek az összes vizsgált pH-n, mint a natív GCD. Jellemzően a RAMEG-indukálta fluoreszcencia erősítés volt a legmagasabb, de pH 3,0-5,0 között a BCD is hasonlóan eredményes fluoreszcencia jelerősítőnek bizonyult.

A Benesi-Hildebrand egyenlet grafikus alkalmazása alapján 1:1 sztöchiometriájú, az anyavegyülethez viszonyítva (pH 5,0:  $\log K = 3,8-4,8$ ) alacsonyabb stabilitású Z14G-CD komplexek (pH 5,0:  $\log K = 2,7-3,3$ ) jönnek létre. A Z14G magasabb stabilitású komplexeket alakított ki  $\gamma$ -CD-ekkel ( $\log K = 2,3-3,3$ ), mint  $\beta$ -CD-vel ( $\log K = 2,0-2,9$ ). A GCD kémiai módosítása kismértékű affinitás emelkedést eredményezett, azonban a tesztelt kémiaailag módosított  $\beta$ -CD származékok nem javították a komplexképzési tulajdonságot.

#### 4.2.2. Zearalenon-14-szulfát interakciója natív és kémiaailag módosított ciklodextrinekkal

A módosított mikotoxinok közé tartozó Z14S fluoreszcens spektruma csak egy gerjesztési csúcsot mutat (330 nm). Azonban lúgos körülmények között (pH 10,0) a Z14S fluoreszcens jelének jelentős csökkenése, valamint a gerjesztési maximumának vörös-, míg emissziós maximumának kékeltolódása figyelhető meg, amit újfent a protonvesztés magyarázhat.

A Z14S-CD kölcsönhatás vizsgálata során a CD-ek jelenlétében jelentős emissziós intenzitás emelkedést, valamint a Z14S emissziós maximumának enyhe kékeltolódását tapasztaltuk. Mivel a CD-ek a vizsgált körülmények között nem mutattak fluoreszcenciát, e megfigyelések a Z14S-CD zárványkomplexek kialakulására utalnak. Enyhén savas körülmények között (pH 5,0) a natív BCD jobb fluoreszcencia erősítő hatást mutatott, mint a natív GCD. Ezért további vizsgálataink során a Z14S natív és kémiaailag módosított  $\beta$ -CD-ekkel kialakított kölcsönhatásait tanulmányoztuk különböző pufferekben (pH 5,0-10,0).

A Z14S-CD kölcsönhatás során a tesztelt CD-ek fluoreszcencia intenzitás emelő hatása pH 5,0 és 7,4 között hasonlóan bizonyult. A kémiaailag módosított  $\beta$ -CD-ek közül a dimetil (DIMEB) és monoamino  $\beta$ -CD (MABCD) származékok jobb fluoreszcencia jelerősítő hatással rendelkeztek pH 5,0-7,4 között, mint a natív BCD. Azonban a pH emelésével a CD-ek jelerősítő hatása csökkent. Lúgos környezetben (pH 10,0) a DIMEB rendelkezett a legnagyobb, míg a kvaterner-ammónium  $\beta$ -CD (QABCD) a legkisebb fluoreszcencia erősítő hatással. Emellett a QABCD jelenlétében a Z14S emissziós maximumának kékeltolódását figyeltük meg 10-es pH-n. Kémhatástól függetlenül, a CD-ek jelenlétében 460 nm körül detektáltuk a Z14S emissziós maximumát (kivéve: QABCD). Ez a megfigyelés, valamint a CD-ek lúgos közegben (pH 10,0) tapasztalt alacsonyabb fluoreszcencia intenzitás erősítő hatása arra utalnak, hogy jellemzően a mikotoxin nem-ionizált formája preferált a Z14S-CD komplexképződés során. Míg a QABCD jelenlétében pH 10,0-en megfigyelt eltérések (alacsonyabb fluoreszcencia erősítés és az emissziós maximum kékeltolódása) arra utalnak, hogy QABCD a mikotoxin ionizált formájával alakít ki kölcsönhatást.

A Benesi-Hildebrand egyenlet grafikus alkalmazása alapján stabil ( $\log K = 3,0-4,7$ ), 1:1-es sztöchiometriájú Z14S-CD komplexek képződnek. A Z14S stabilabb komplexeket alakít ki

natív BCD-nel ( $\log K = 3,6$ ), mint natív GCD-nel ( $\log K = 3,1$ ). Savas és fiziológiás körülmények között (pH 5,0 és 7,4) a DIMEB és RAMEB kötődött a legmagasabb affinitással Z14S-hoz. Lúgos közegben (pH 10,0) jellemzően alacsonyabb stabilitású Z14S-CD komplexek képződését tapasztaltuk pH 5,0-7,4-hez képest (kivéve QABCD), ami szintén alátámasztja azt, hogy a vizsgált CD-ek elsősorban a Z14S protonált formájával lépnek kölcsönhatásba. Azonban a QABCD pH 10,0-en képezte a legstabilabb komplexeket Z14S-tal, ami szintén igazolja, hogy a QABCD a deprotonált formához kötődik magasabb affinitással. Ez valószínűleg azzal magyarázható, hogy az oldalláncok (kvaterner-ammónium kation) elektrosztatikus kölcsönhatásokat alakítanak ki a mikotoxin anionnal, ami stabilizálja az inklúziót. További vizsgálatainkban szolubilis CD polimerekkel is végeztünk kísérleteket, de csak kisebb eltéréseket tapasztaltunk a monomerekhez viszonyítva.

Korábban sikeresen alkalmazták a CD-indukált fluoreszcencia erősítést kukoricaminták ZEN szennyezettségének analitikai meghatározására, ez alapján, valamint a megfigyeléseink alapján a CD technológia alkalmas lehet az anyavegyületnél jóval hidrofílebb tulajdonságú, és nehezen detektálható maszkolt és módosított ZEN származékok detektálhatóságának érzékenyítésére is.

#### *4.2.3. Zearalenon és zearalenolok extrakciója vizes oldatokból $\beta$ -ciklodextrin gyöngypolimerrel*

A ZEN,  $\alpha$ - és  $\beta$ -ZEL BBP-rel történő vizes oldatokból való eltávolíthatóságának vizsgálata során vízben nem oldódó mikrogöngyökhöz kapcsolt  $\beta$ -CD polimerrel kötöttük meg az oldatok mikotoxin tartalmának egy részét. A BBP koncentrációfüggő módon csökkentette az oldatok ZEN/ZEL tartalmát. Ez alapján a BBP jelentősen szennyezett minták mikotoxin mentesítése során is alkalmazható. A BBP már 5 perces inkubációt követően jelentős, kb. 70-80%-os ZEN és  $\alpha/\beta$ -ZEL csökkenést eredményezett az oldatokban a kiindulási mikotoxin koncentrációhoz képest, majd 30 perc elteltével kb. 85-90%-os redukción tapasztaltunk, ami az inkubációs idő további növelésével már nem változott. Ezzel szemben, az inkubációs hőmérséklet változása nem befolyásolta jelentős mértékben az extrakció mértékét. A ZEN és ZEL-ok BBP általi extrakciója során az alacsonyabb pH-k (pH 5,0-7,4) kedvezőbbnek bizonyultak a mikotoxinkötés szempontjából. A pH emelésével a ZEN és ZEL-ok deprotonálódnak, az így képződő anionokat alacsonyabb affinitással köti a BBP, ami csökkenti az extrakció hatékonyságát.

#### *4.2.4. $\beta$ -ciklodextrin gyöngypolimer regenerálhatóságának vizsgálata*

Korábbi vizsgálatok alapján a CD zárványkomplexek esetében a szerves oldószerek képesek a ligandum molekulák kiszorítására a lipofil CD üregből. Ezért kísérleteink során kétféle 50 v/v%-os etanol-víz eleggyel történő mosással próbáltuk regenerálni a BBP-t ZEN kötést követően. Eredményeink alapján, az etanol-víz eleggyel végzett mosás során a BBP által kötött ZEN gyakorlatilag teljes mértékben visszanyerhető, majd ezt követően a regenerált BBP ugyanolyan hatékonyan használható föl a ZEN extrakciójára mint korábban. Ez alapján a BBP gazdaságos mikotoxinkötőnek tűnik vizes oldatok és/vagy italok toxinmentesítésére. Emellett e megfigyelés alapján a BBP alkalmas lehet az analitikai mintadúsítás területén való felhasználásra is.

#### 4.2.5. Zearalenon extrakciója kukoricasörből $\beta$ -ciklodextrin gyöngypolimerrel

Tekintve, hogy a ZEN gyakori szennyező kukoricában, illetve korábbi tanulmányok beszámoltak sörminták nmol/L (szélsőséges esetekben  $\mu$ mol/L) koncentrációjú ZEN szennyezéséről, a BBP alkalmazhatóságát vizsgáltuk ZEN-nal spike-olt kukoricasörminták mikotoxinmentesítése kapcsán. Mivel a BBP nem ZEN szelektív kötővegyület, valamint a CD-ek képesek egyes élelmiszer komponensekkel is kölcsönhatásba lépni, a sör egyes minőségi paramétereit (szín és összpolicfenol tartalom) is tanulmányoztuk. Magasabb BBP koncentrációk jelenlétében (13,3 és 26,7 mg/mL) kb. 90-95%-os, hasonlóan eredményes ZEN-kötést figyeltünk meg, mint amit 6,67-13,3 mg/mL BBP jelenléte okozott vizes oldatokban. A BBP mennyiségének növelése a sör színintenzitásának és összpolicfenol tartalmának fokozatos csökkenését okozta, azonban a BBP sokkal nagyobb relatív ZEN extrakciót eredményezett az összpolicfenol tartalomban és a sör színintenzitásában tapasztalt relatív változásokhoz képest.

#### 4.2.6. Konjugált zearalenon metabolitok vizes oldatokból történő extrakciója $\beta$ -ciklodextrin gyöngypolimerrel

További vizsgálatainkban a BBP Z14G és Z14S extrakciós képességét is tanulmányoztuk. A BBP koncentrációfüggő módon csökkentette a konjugált ZEN származékok mennyiségét vizes oldatokban. A Z14G kapcsán alacsonyabb extrakciós képességet tapasztaltunk, mint az anyavegyületnél, ami jól korrelál a Z14G és a ZEN BCD monomer iránti affinitásbeli eltéréseivel. A BBP az anyavegyülethez hasonló sikerességgel csökkentette a minták Z14S tartalmát, ami összhangban van a Z14S-BCD és a ZEN-BCD komplexek esetében meghatározott kötési állandókkal.

Megfigyeléseink alapján a BBP alkalmasnak tűnik ZEN,  $\alpha$ - és  $\beta$ -ZEL, valamint az anyavegyületnél jóval hidrofilebb konjugált ZEN metabolitok vizes oldatokból és/vagy italokból történő extrakciójára. Mivel a CD-ek kémiai módosítása előnyösen befolyásolhatja a mikotoxin-CD komplexek stabilitását, elképzelhető, hogy a BBP kémiai módosításával még eredményesebb és szelektívebb mikotoxinkötők is kifejleszthetők.



## 5. Új megfigyelések

- A ZEN,  $\alpha$ - $\beta$ -ZEL, ZAN,  $\alpha$ / $\beta$ -ZAL és Z14S stabil komplexeket képeznek szérum albuminnal ( $K = 10^4$ - $10^5$  L/mol), ezért a mikotoxinok plazmafehérjekötődése befolyásolhatja toxikokinetikai tulajdonságaikat.
- A  $\beta$ -ZEL/ZAL lényegesen alacsonyabb stabilitású komplexeket képeznek HSA-nal, mint a ZEN vagy akár az  $\alpha$ -ZEL/ZAL. A kötési állandóik kapcsán megfigyelt eltérések e mikotoxinok eltérő kötőhelyére vagy kötési pozíciójára utalhatnak.
- A ZEN, a redukált ZEN metabolitok és a Z14S albuminkötődése jelentős faji eltéréseket mutat. Ezeket szem előtt kell tartani a különböző állatfajokon végzett kísérletek és azok eredményeinek egyéb fajokra történő extrapolációja során.
- A ZEN és metabolitjai eltérő módon befolyásolják a site I marker warfarin albuminkötődését, feltehetőleg allosztérikus módon.
- A ZEN konjugált metabolitjai kölcsönhatásba lépnek CD-ekkel, ami a mikotoxinok fluoreszcencia intenzitásának jelentős emelkedésével jár, ezért e kölcsönhatások alkalmasak lehetnek fluoreszcens analitikai módszerek érzékenyítésére.
- A Z14G stabilabb komplexeket képez GCD-nel és származékaival, mint  $\beta$ -CD-ekkel; azonban a lúgos környezet nem kedvez a kölcsönhatásoknak.
- A Z14S metil- $\beta$ -CD származékokkal képezte a legstabilabb komplexeket savas és fiziológiás környezetben, azonban pH 10,0-en QABCD-nel alakította ki a legstabilabb komplexet.
- A ZEN és metabolitjai sikeresen megköthetők BBP-rel vizes oldatokból és/vagy sörből; lúgos közegben az extrakció kevésbé hatékony.
- A BBP szerves oldószeres (50 v/v% etanol-víz elegy) mosással regenerálható és újra felhasználható, valamint analitikai mintadúsítás területén történő felhasználásra is alkalmasnak tűnik.

## 6. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Poór Miklós egyetemi adjunktusnak a PhD tanulmányaim során nyújtott szakmai útmutatásáért, tanácsaiért, segítségéért és lelkiismeretes munkájáért. Szeretném megköszönni Prof. Dr. Pethő Gábornak, a Gyógyszerhatástani Tanszék, és a Toxicológia program vezetőjének, segítőkészségét, példamutató oktatói munkáját és hogy lehetőséget nyújtott a Tanszéken való munkámra. Köszönettel tartozom továbbá Dr. Németi Balázsnak, a Gyógyszerhatástani Tanszék korábbi vezetőjének, valamint Prof. Dr. Gregus Zoltánnak, a Toxicológia program korábbi vezetőjének, példamutató szakmai elhivatottságáért, segítőkészségéért és lelkiismeretes munkájáért. Köszönetet szeretnék mondani a disszertációm alapjául szolgáló közleményekben közreműködő kollaborátorainknak, Dr. Afshin Zandnak, Dr. Bálint Mónikának, Dr. Bencsik Tímeának, Dr. Chiara Dall'Astanak, Dr. Gianni Galavernanak, Dr. Hetényi Csabának, Dr. Kunsági-Máté Sándornak, Dr. Kuzma Mónikának, Dr. Lemli Beátának, Dr. Luca Dellafioranak, Dr. Mayer Mátyásnak, Dr. Sente Lajosnak és Szerencsés Dénesnek. Továbbá, szeretném megköszönni minden megjelent közleményünkben közreműködő és a jelenleg is futó kutatásainkban részt vállaló kollaborátorunk munkáját, valamint külön köszönettel tartozom Prof. Dr. Kőszegi Tamásnak és Csepregi Ritának a közös munkáink során nyújtott segítségükért. Továbbá, szeretnék köszönetet mondani Dr. Fliszár-Nyúl Eszter és Fábíán Katalin kolléganőimnek, valamint Dr. Almásiné Rubint Eszternek és Schweibert Istvánnak a HPLC-analízisek kapcsán nyújtott segítségükért. Köszönöm korábbi és jelenlegi TDK-hallgatóim, Dr. Vörös Virág és Skaper Renáta, fluoreszcencia spektroszkópiai kísérletek során végzett munkáját. Kiemelt köszönettel tartozom a Gyógyszerhatástani Tanszék munkatársainak, hogy vidám, örömteli környezetet biztosítottak a mindennapi munkámhoz. Köszönöm PhD-hallgató társamnak, Dr. Mohos Violetának, hogy jelenlétével és támogatásával átsegített a tanulmányaim során felmerülő nehézségeken. Továbbá köszönöm a PTE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet minden tagjának, hogy helyet és szívélyes környezetet biztosítottak számunkra.

Végül szeretném megköszönni családomnak, szeretteimnek és barátaimnak a mérhetetlen támogatást, biztatást, és a biztos hátteret, amit biztosítottak számomra, és ami nélkül nem jöhetett volna létre ez a dolgozat.

## 7. Saját közlemények listája

### 7.1. Jelen dolgozat alapjául szolgáló folyóiratcikkek

Miklós Poór, **Zelma Faisal**, Afshin Zand, Tímea Bencsik, Lajos Szenté. Removal of zearalenone and zearalenols from aqueous solutions using insoluble beta-cyclodextrin bead polymer. *Toxins* **2018**, 10, 216. [IF: 3,895; Q1]

**Zelma Faisal**, Beáta Lemli, Dénes Szerencsés, Sándor Kunsági-Máté, Mónika Bálint, Csaba Hetényi, Mónika Kuzma, Mátyás Mayer, Miklós Poór. Interactions of zearalenone and its reduced metabolites  $\alpha$ -zearalenol and  $\beta$ -zearalenol with serum albumins: species-dependent alternations, binding sites, and thermodynamics. *Mycotoxin Research* **2018**, 34, 269-278. [IF: 3,741; Q2]

**Zelma Faisal**, Eszter Fliszár-Nyúl, Luca Dellafiora, Gianni Galaverna, Chiara Dall'Asta, Beáta Lemli, Sándor Kunsági-Máté, Lajos Szenté, Miklós Poór. Cyclodextrins Can Entrap Zearalenone-14-Glucoside: Interaction of the Masked Mycotoxin with Cyclodextrins and Cyclodextrin Bead Polymer. *Biomolecules* **2019**, 9, 354. [IF: 4,082; Q1]

**Zelma Faisal**, Eszter Fliszár-Nyúl, Luca Dellafiora, Gianni Galaverna, Chiara Dall'Asta, Beáta Lemli, Sándor Kunsági-Máté, Lajos Szenté, Miklós Poór. Interaction of zearalenone-14-sulfate with cyclodextrins and the removal of the modified mycotoxin from aqueous solution by beta-cyclodextrin bead polymer. *Journal of Molecular Liquids* **2020**, 310, 113236. [IF: 5,065\*; Q1]

**Zelma Faisal**, Virág Vörös, Eszter Fliszár-Nyúl, Beáta Lemli, Sándor Kunsági-Máté, Miklós Poór. Interactions of zearalenone,  $\alpha$ -zearalenol,  $\beta$ -zearalenol, zearalenone-14-sulfate, and zearalenone-14-glucoside with serum albumin. *Mycotoxin Research* **2020**, 36, 389-397. [IF: 3,164\*; Q2]

\*2019-es évre számított impakt faktorok

**A dolgozat alapjául szolgáló folyóiratcikkek összesített impakt faktora: 19,947**

### 7.2. Jelen dolgozat alapjául szolgáló egyéb közlemények

**Zelma Faisal**, Afshin Zand, Tímea Bencsik, Lajos Szenté, Miklós Poór. Removal of zearalenone and its metabolites from aqueous solutions by insoluble  $\beta$ -cyclodextrin bead polymer. *4<sup>th</sup> International Cholnoky Symposium* (Pécs, Magyarország, 2018.05.10-11.; előadás)

**Zelma Faisal**, Virág Vörös, Rita Csepregi, Tamás Kőszegi, Beáta Lemli, Sándor Kunsági-Máté, Mónika Bálint, Csaba Hetényi, Lajos Szenté, Miklós Poór. Interactions of zearalenone and its reduced metabolites with serum albumins and cyclodextrins. *5<sup>th</sup> International Cholnoky Symposium* (Pécs, Magyarország, 2019.04.25.; előadás)

**Faisal Zelma**, Fliszár-Nyúl Eszter, Dellaflora Luca, Galaverna Gianni, Dall'Asta Chiara, Szente Lajos, Poór Miklós. Zearalenon-14-glükózid interakcióinak vizsgálata ciklodextrinokkal és béta-ciklodextrin gyöngypolimerrel – vajon a ciklodextrinek kölcsönhatásba lépnek a maszkolt mikotoxinnal? *TOX2019 Tudományos Konferencia* (Szeged, Magyarország, 2019.10.09-11.; előadás)

**Faisal Anna Zelma**, Góder Beatrix, Szerencsés Dénes, Lemli Beáta, Poór Miklós. Zearalenon,  $\alpha$ -zearalenol és  $\beta$ -zearalenol kölcsönhatásainak vizsgálata human és egyéb albuminokkal. *TOX2017 Tudományos Konferencia* (Bükfürdő, Magyarország, 2017.10.11-13.; poszter)

Miklós Poór, Virág Vörös, Dénes Szerencsés, **Zelma Faisal**, Beáta Lemli, Sándor Kunsági-Máté, Mónika Bálint, Csaba Hetényi, Interaction of zearalenone and its reduced metabolites with serum albumins. *40<sup>th</sup> Mycotoxin Workshop* (München, Németország, 2018.06.11-13.; poszter)

#### **Egyéb folyóiratcikkek:**

Franziska Sueck, Miklós Poór, **Zelma Faisal**, Christoph G. W. Gertzen, Benedikt Cramer, Beáta Lemli, Sándor Kunsági-Máté, Holger Gohlke, Hans-Ulrich Humpf. Interaction of ochratoxin A and its thermal degradation product 2'R-ochratoxin A with human serum albumin. *Toxins* **2018**, 10, 256. [IF: 3,895; Q1]

**Zelma Faisal**, Diána Derdák, Beáta Lemli, Sándor Kunsági-Máté, Mónika Bálint, Csaba Hetényi, Rita Csepregi, Tamás Kőszegi, Franziska Sueck, Hans-Ulrich Humpf, Benedikt Cramer, Miklós Poór. Interaction of 2'R-ochratoxin A with Serum Albumins: Binding Site, Effects of Site Markers, Thermodynamics, Species Differences of Albumin-binding, and Influence of Albumin on Its Toxicity in MDCK Cells. *Toxins* **2018**, 10, 353. [IF: 3,895; Q1]

**Zelma Faisal**, Virág Vörös, Beáta Lemli, Diána Derdák, Sándor Kunsági-Máté, Mónika Bálint, Csaba Hetényi, Rita Csepregi, Tamás Kőszegi, Dominik Bergmann, Franziska Sueck, Hans-Ulrich Humpf, Florian Hübner, Miklós Poór. Interaction of the mycotoxin metabolite dihydrocitrinone with serum albumin. *Mycotoxin Research* **2019**, 35, 129-139. [IF: 3,164; Q2]

**Zelma Faisal**, Sándor Kunsági-Máté, Beáta Lemli, Lajos Szente, Dominik Bergmann, Hans-Ulrich Humpf, Miklós Poór. Interaction of dihydrocitrinone with native and chemically modified cyclodextrins. *Molecules* **2019**, 24, 1328. [IF: 3,267; Q1]

**Zelma Faisal**, Edina Garai, Rita Csepregi, Katalin Bakos, Eszter Fliszár-Nyúl, Lajos Szente, Adrienn Balázs, Mátyás Cserhádi, Tamás Kőszegi, Béla Urbányi, Zsolt Csenki, Miklós Poór. Protective effects of beta-cyclodextrins vs. zearalenone-induced toxicity in HeLa cells and *Tg(vtg1:mCherry)* zebrafish embryos. *Chemosphere* **2020**, 240, 124948 [IF: 5,778\*; D1/Q1]

**Zelma Faisal**, Virág Vörös, Eszter Fliszár-Nyúl, Beáta Lemli, Sándor Kunsági-Máté, Rita Csepregi, Tamás Kőszegi, Ferenc Zsila, Miklós Poór. Probing the Interactions of Ochratoxin B, Ochratoxin C, Patulin, Deoxynivalenol, and T-2 toxin with Human Serum Albumin. *Toxins* **2020**, 12, 392. [IF: 3,531\*; Q1]

**Zelma Faisal**, Violetta Mohos, Eszter Fliszár-Nyúl, Kateřina Valentová, Kristýna Káňová, Miklós. Interactions of silymarin components and their sulfated metabolites with human serum albumin and cytochrome P450 enzymes. *Biomedicine and Pharmacotherapy* **2021**, 138, 111459 [IF: 4,545\*; Q1]

Eszter Fliszár-Nyúl, **Zelma Faisal**, Violetta Mohos, Diána Derdák, Beáta Lemli, Tamás Kálai, Cecília Sár, Balázs Z. Zsidó, Csaba Hetényi, Ádám I. Horváth, Zsuzsanna Helyes, Ruth Deme, Dóra Bogdán, Andrea Czompa, Péter Mátyus, Miklós Poór. Interaction of SZV 1287, a novel oxime analgesic drug candidate, and its metabolites with serum albumin. *Journal of Molecular Liquids* **2021**, online, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.115945> [IF: 5,065\*; Q1]

### 7.3. Egyéb közlemények:

Virág Vörös, **Zelma Faisal**, Mónika Bálint, Csaba Hetényi, Beáta Lemli, Rita Csepregi, Miklós Poór. Interactions of mycotoxin metabolites 2'R-ochratoxin A and dihydrocitrinone with human serum albumin. *4<sup>th</sup> International Cholnoky Symposium* (Pécs, Magyarország, 2018.05.10-11.; előadás)

**Faisal Zelma**, Vörös Virág, Derdák Diána, Lemli Beáta, Bálint Mónika, Hetényi Csaba, Csepregi Rita, Sueck Franziska, Humpf Hans-Ulrich, Cramer Benedikt, Poór Miklós. Ochratoxin A és 2'R-ochratoxin A kölcsönhatásainak vizsgálata szérum albuminnal. *TOX2018 Tudományos Konferencia* (Lillafüred, Magyarország, 2018.10.17-19.; előadás)

Poór Miklós, **Faisal Zelma**, Csepregi Rita, Lemli Beáta, Kunsági-Máté Sándor, Sente Lajos. Mikotoxin-ciklodextrin kölcsönhatások vizsgálata és gyakorlati hasznosíthatóságuk. *TOX2018 Tudományos Konferencia* (Lillafüred, Magyarország, 2018.10.17-19.; előadás)

Miklós Poór, Eszter Fliszár-Nyúl, Violetta Mohos, **Zelma Faisal**, Beáta Lemli. Pharmacological/toxicological importance of albumin-ligand interactions. *5<sup>th</sup> International Cholnoky Symposium* (Pécs, Magyarország, 2019.04.25.; előadás)

**Zelma Faisal**, Sándor Kunsági-Máté, Beáta Lemli, Lajos Sente, Dominik Bergmann, Hans-Ulrich Humpf, Miklós Poór. Interaction of the mycotoxin metabolite dihydrocitrinone with native and chemically modified cyclodextrins. *4<sup>th</sup> Symposium on Weak Molecular Interactions* (Matsue, Japán, 2019.05.17-19.; előadás)

Miklós Poór, Eszter Fliszár-Nyúl, Violetta Mohos, **Zelma Faisal**, Beáta Lemli, Csaba Hetényi, Sándor Kunsági-Máté. Pharmacological/toxicological importance and investigation of albumin-ligand interactions. *4<sup>th</sup> Symposium on Weak Molecular Interactions* (Matsue, Japán, 2019.05.17-19.; előadás)

Poór Miklós, **Faisal Zelma**, Fliszár-Nyúl Eszter. Mikotoxin-albumin kölcsönhatások vizsgálata és jelentőségük. *TOX2019 Tudományos Konferencia* (Szeged, Magyarország, 2019.10.09-11.; előadás)

**Zelma Faisal**, Virág Vörös, Beáta Lemli, Mónika Bálint, Csaba Hetényi, Rita Csepregi, Franziska Sueck, Benedikt Cramer, Hans-Ulrich Humpf, Miklós Poór. Interaction of 2'R-ochratoxin A with serum albumins. *40<sup>th</sup> Mycotoxin Workshop* (München, Németország, 2018.06.11-13.; poszter)

Vörös Virág, **Faisal Zelma**, Derdák Diána, Lemli Beáta, Bálint Mónika, Hetényi Csaba, Csepregi Rita, Poór Miklós. Dihidrocitrinon kölcsönhatásának vizsgálata szérumban. *TOX2018 Tudományos Konferencia* (Lillafüred, Magyarország, 2018.10.17-19.; poszter)

**Zelma Faisal**, Rita Csepregi, Tamás Kőszegi, Lajos Szente, Miklós Poór. Effects of native and chemically modified beta-cyclodextrins on the in vitro cytotoxicity of zearalenone. *41<sup>th</sup> Mycotoxin Workshop* (Lisszabon, Portugália, 2019.05.06-08.; poszter)

Virág Vörös, **Zelma Faisal**, Rita Csepregi, Tamás Kőszegi, Miklós Poór. Testing the interactions of deoxynivalenol, patulin, and T-2 toxin with human serum albumin. *41<sup>th</sup> Mycotoxin Workshop* (Lisszabon, Portugália, 2019.05.06-08.; poszter)

Garai Edina, **Faisal Zelma**, Bakos Katalin, Szente Lajos, Urbányi Béla, Poór Miklós, Csenki Zsolt, A béta-cyclodextrinek védőhatása a zearalenon által indukált toxicitásra TG(VTG1:MCHERRY) zebadánió embriókban. *TOX2019 Tudományos Konferencia* (Szeged, Magyarország, 2019.10.09-11.; poszter)

**Kumulatív impakt faktor: 53,087**

**Független hivatkozások összesen: 32**