

A metotrexát és egyes analogonjainak másodlagos kölcsönhatásai és antioxidáns tulajdonságai

Doktori (PhD) értekezés



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

Gyógyszerészettudományi Kar

Szerves és Gyógyszerkémiai Intézet

Pécs
2022

**„Mert bölcseség megy a te elmédbe és a tudomány a te lelkedben
gyönyörűséges lesz.”**

Példabeszédek könyve 2:10

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	5
1. Bevezetés	7
2. Irodalmi áttekintés.....	8
2.1. A metotrexát (MTX).....	8
2.1.1. Történeti visszatekintés, a MTX terápiás alkalmazása	8
2.1.2. Farmakokinetika	9
2.1.3. Hatásmechanizmus	10
2.1.4. Mellékhatások és kivédési lehetőségeik	12
2.1.5. A MTX fényérzékenysége	14
2.2. A Phototrexate (PHX)	15
2.2.1. Fotofarmakológia	15
2.2.2. A fotofarmakológia daganatellenes alkalmazásának lehetőségei	16
2.3. A humán szérum albumin (HSA).....	20
2.3.1. A HSA tulajdonságai.....	20
2.3.2. A HSA funkciói.....	20
2.4. Kalixarének, rezorcinarén-alapú kavitandok	23
3. Célkitűzések.....	25
4. Anyagok és módszerek	26
4.1. Reagensek	26
4.2. A PHX szintézise	26
4.3. A Kavitandszármazékok szintézise	27
4.4. Műszerek	27
4.5. MTX-nak és fotodegradációs termékeinek HSA-nal való kölcsönhatása ..	28
4.6. MTX és PHX kavitandszármazékokkal való kölcsönhatása	29
4.7. Xantin-oxidáz (XO) esszé hipoxantin (HX) szubsztráttal.....	30
4.8. ABTS esszé	31
4.9. Számítógépes modellezés.....	31
4.10. Statisztika	32
5. Eredmények.....	33

5.1. MTX-nak és fotodegradációs termékeinek HSA-nal való kölcsönhatása ..	33
5.1.1. A MTX fotodegradációja	33
5.1.2. A kölcsönhatások kötési termodinamikája.....	33
5.1.3. A HSA hődenaturációjának kinetikájára gyakorolt hatás	36
5.2. MTX és PHX kavitandszármazékokkal való kölcsönhatása	38
5.2.1. MTX-TAC kölcsönhatás vizsgálata.....	38
5.2.2. A PHX izomereinek TAC-dal és TDC-dal való kölcsönhatása.....	42
5.3. Xantin-oxidáz (XO) esszé hipoxantin (HX) szubsztráttal.....	48
5.4. ABTS esszé	50
6. Megbeszélés, következtetések	52
6.1. MTX-nak és fotodegradációs termékeinek HSA-nal való kölcsönhatása ..	52
6.2. MTX és PHX kölcsönhatásai kavitandszármazékokkal	53
6.3. MTX és PHX antioxidáns tulajdonságainak összehasonlítása	55
7. Összefoglalás.....	57
8. Új megállapítások	58
9. Irodalomjegyzék.....	59
10. Saját közlemények listája	69
10.1. Jelen dolgozat alapjául szolgáló folyóiratcikkek	69
10.2. Jelen dolgozat alapjául szolgáló konferencia-előadások és poszter prezentációk	69
10.3. Egyéb folyóiratcikkek.....	69
10.4. Egyéb konferencia-előadások és poszter prezentációk	70
10.5. Szerkesztői tevékenység	70
11. Köszönetnyilvánítás	71

Rövidítések jegyzéke

ABGA	<i>p</i> -amino-benzoilglutaminsav
ABTS	2,2'-azino-bisz-3-etilbenzotiazolin-6-szulfonsav
ABTS• ⁺	2,2'-azino-bisz-3-etilbenzotiazolin-6-szulfonsav kation gyök
AICAR	5-aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotid
ALL	akut limfoid leukémia
AMP	adenozin-monofoszfát
ANOVA	analysis of variance
AO	aldehyd-oxidáz
ATIC	5-aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotid formiltranszferáz
ATP	adenozin-trifoszfát
CA4	combreastatin A4
CPS	counts per second
CVD	kardiovaszkuláris betegség
DAMPA	2,4-diamino-10-metilpteroilsav
DFP	2,4-diamino-6-formilpterin
DHF	dihidrofolát
DHFR	dihidrofolát-reduktáz
DMSO	dimetil-szulfoxid
E _a	aktiválási energia
EPR	elektron paramágneses rezonancia
FBP	folátkötő fehérje
FOLR1	folátreceptor 1
GART	foszforibozil-glicinamid formiltranszferáz
GI	gasztrointesztinális
GM-CSF	granulocita-makrofág kolóniastimuláló faktor
GTP	guanozin-trifoszfát
H _r	felfűtési sebesség
HSA	humán szérum albumin
HX	hipoxantin
I	intenzitás
IFN γ	interferon-gamma
IL	interleukin

k	reakciósebességi együttható
K	kötési állandó
MTX	metotrexát
MTXglu	poliglutamilált metotrexát
N-hidroxi-TEMPOL	1-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-piperidin-4-ol
PBS	phosphate buffered saline
PHX	Phototrexate
R	egyetemes gázállandó
RA	reumatoid arthritisz
RFC1	redukált folátkarrier 1
SEM	standard hiba
SLC19A1	szolubilis karrier molekulacsalád 19 1-es tagja
T	hőmérséklet
t. e.	tetszőleges egység
TAC	tetrakis(androszt-4-én-3-on-17 α -etinil)-kavitand
TDC	tetrakis(3,5-dikarboxilátofenoxy)-kavitand
TEAC	Trolox ekvivalens antioxidáns kapacitás
THF	tetrahidrofolát
T _{max}	termogram csúcsintenzitásához tartozó hőmérséklet
TNF- α	tumor nekrózis faktor alfa
UV	ultraibolya
XO	xantin-oxidáz
ΔG	szabadalpinia-változás
ΔH	entalpiaváltozás
ΔS	entrópiaváltozás
λ_{ex}	gerjesztési hullámhossz

1. Bevezetés

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

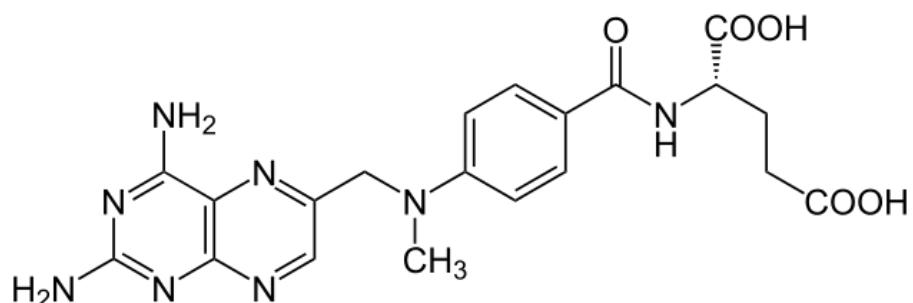
A rezorcinarén alapú kavitandok kehely alakú, gyűrűs szerkezetű befogadó molekulák. Az alapvízhez kapcsolódó molekularészek jelentősen befolyásolhatják, hogy az adott kavitand milyen molekulákat képes komplexálni, illetve hogy a létrejövő másodlagos kölcsönhatás milyen erős lesz. Ezért a kavitandok alkalmasak lehetnek gyógyszerszállító 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 szisztemás 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 antioxidáns hatást.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A metotrexát (MTX)

A metotrexát (MTX, 4-{N-[{(2,4-diaminopteridin-6-il) metil]-N-metilamino} benzoil]-L-glutaminsav) egy pteridinből, *p*-amino-benzoesavból és L-glutaminsavból álló folsavszármazék (**1. ábra**).



1. ábra: A MTX szerkezeti képlete

2.1.1. Történeti visszatekintés, a MTX terápiás alkalmazása

Habár a daganatok kialakulásának oka, a neoplasztikus elváltozás már évszázadok óta ismert, a daganatellenes terápia az 1940-es évekig a sebészeti beavatkozásokon alapult, ekkor azonban sikerült bebizonyítani a nitrogén-mustárokról, hogy képesek remissziót előidézni limloid daganatokban szenvedő betegek esetében. Ez jelentette a kemoterápia kezdetét (Gilman, 1963; Chabner és Roberts, 2005).

A következő fontos előrelépés nem sokkal a második világháború után jött el, mikor Sydney Farber patológus megfigyelte, hogy akut limloid leukémiában (ALL) a folsav elősegítette a leukémiás sejtek osztódását, ezáltal a betegség progresszióját. Biokémikus munkatársa, Yellapragada Subbarow (aki az adenozin-trifoszfát biológiai funkcióinak felfedezéséért is ismert) segítségével folsav analógokat, aminopterint és ametopterint (ismertebb nevén metotrexát, MTX) állítottak elő, melyek segítségével – a működésükhez folsavat igénylő enzimek gátlása által – elsőként sikerült elérni a betegség remisszióját ALL-ben szenvedő betegekben (Farber és mtsai., 1948). Toxicitása miatt az aminopterint a klinikai gyakorlatban felváltotta a MTX, mely ezt követően számos daganattípus esetén hatékonynak bizonyult.

1951-ben megfigyelték, hogy az alacsony dózisú (heti 5-25 mg) MTX-nak gyulladáscsökkentő és immunszuppresszáns hatása van, így kiderült, hogy a daganatokon kívül autoimmun betegségek terápiájában is hatékony lehet (Gubner és mtsai., 1951).

Napjainkban a MTX elsőként választandó hatóanyag daganatellenes hatása miatt oszteoszarkómá, illetve különböző koriokarcinómák, leukémiák és limfómák terápiájában, immunszuppresszív szerként pedig reumatoid arthritisz (RA) és pszoriázis esetén (Kieseier, 2010; Shams és mtsai., 2021).

2.1.2. Farmakokinetika

Immunszuppresszív szerként a MTX-ot leggyakrabban orálisan adagolják, dózisa pedig ebben az esetben általában kevesebb, mint 15 mg/hét. A MTX farmakokinetikáját nagy intra- és interindividuális különbségek jellemzik (Plard és mtsai., 2007; Schmiegelow, 2009). Orális adagolás esetén a jejunum proximális szakaszán abszorbeálódik aktív transzporttal, a szolubilis karrier molekulacsalád 19 1-es tagján (SLC19A1, régi nevén redukált folátkarrier 1, RFC1), anionos folátranszporteren vagy egy folátkötő fehérjén (FBP, másnéven folátreceptor 1, FOLR1) keresztül (Assaraf, 2007; Walling, 2006). Ezek közül a legfontosabb az SLC19A1 szerepe, melynek MTX iránti affinitása megegyezik a természetes folátokéval, így a MTX és a természetes folátok között kompetíció alakul ki (Walling, 2006).

Orális biohasznosulása kisebb dózisok esetén kb. 50%, azonban 15 mg/hét felett ez az érték csökken, az SLC19A1 receptorok telítődése miatt (Tian és Cronstein, 2007), ezért daganatellenes indikációban parenterális úton juttatják a hatóanyagot a szervezetbe (szubkután, intramuszkuláris, intravénás vagy intratekális adagolás). Az orális biohasznosulás jelentősen csökkenthet malabszorpció vagy az SLC19A1 receptorok mutációja esetében is (Puig, 2014; Hayashi és mtsai, 2013).

Szubkután alkalmazásának előnye, hogy 100%-os biohasznosulás érhető el, és egyszerűbb a gyógyszer beadása, mint intravénás adagolás esetén (Balis és mtsai, 1988). Intramuszkuláris úton a biohasznosulás kb. 76%, tehát jobb, mint orális bevitel esetén, azonban rosszabb, mint szubkután módon (Teresi és mtsai, 1987). Inratekálisan ritkán alkalmazzák, néhány hematológiai betegség lokális kezelésében (Kwong és mtsai., 2009). Az agy-gerincvelői folyadékból a vérplazmába való jutásának mértéke nem ismert, azonban valószínűleg nagyobb arányban szívódik fel, mint orálisan alkalmazva (Bostrom és mtsai., 2003).

A vérplazmában 35-50%-ban kötődik HSA-hoz, ezért leszorításos kölcsönhatás alakulhat ki a MTX és olyan hatóanyagok között, melyek nagymértékben kötődnek HSA-hoz (pl. szalicilátok, tetraciklinek, szulfonamidok) (Yélamos és Puig, 2015). A MTX az extravaskuláris térben halmozódik fel.

A MTX több mint 90%-át a vesék választják ki és a vizelettel ürül ki a szervezetből, ezért beszűkült veseműködés jelentősen lelassíthatja a hatóanyag eliminációját (Levêque és mtsai., 2011). A fennmaradó kevesebb, mint 10% nagy részét a májban az aldehid-oxidáz (AO) 7-hidroximetotrexáttá alakítja, mely egy inaktív metabolit. A nem vizelettel ürülő MTX kisebb részét az epe választja ki, valószínűleg ezáltal keletkezik a másik (szintén inaktív) metabolitja, a 2,4-diamino-10-metilpteroilsav (DAMPA), mely a bélbe exkretált MTX-ból keletkezik, a bélbaktériumok karboxipeptidáz enzimei általi hidrolízissel (Widemann és Adamson, 2006). A MTX részt vesz az enterohepatikus körforgásban. (Tian és Cronstein, 2007).

A sejtekben a MTX poliglutamilálódik a folilpoliglutamát szintáz enzim által. Az így képződő poliglutamilált MTX (MTXglu) egy aktív metabolit, mely negatív töltése miatt intracellulárisan felhalmozódik, lassan jut ki a sejtekből (Mikkelsen és mtsai., 2011). gátolja a DHFR enzimen kívül a foszforibozil-glicinamid formiltranszferáz (GART) és az 5-aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotid formiltranszferáz (ATIC) enzimeket is (Walling, 2006; Allegra és mtsai. 1985). A MTXglu intracellulárisan felhalmozódik, negatív töltése miatt lassan jut ki a sejtekből (Mikkelsen és mtsai., 2011).

2.1.3. Hatásmechanizmus

Az elmúlt évtizedekben kiderült, hogy a MTX összetett módon, több biokémiai útvonalon fejti ki daganatellenes, illetve immunszuppresszáns, gyulladáscsökkentő hatását.

Daganatellenes hatásmódja alapján a MTX az antimetabolitok közé, ezen belül az antifolátok csoportjába tartozik. Az antifolátok hamis folát kofaktorként viselkednek, ezáltal gátolják a purin és timidilát bioszintézis egy vagy több fontos enzimatikus lépését (Walling, 2006). Immortalizált sejtvonalakon végzett vizsgálatok szerint a MTX nagyobb koncentrációban (legalább 1 μ M) nemcsak a sejtosztódást gátolja (citostatikus hatás), hanem apoptózist is indukál (citotoxikus hatás) (Li és Kaminskas, 1984; Huang és mtsai., 2011).

A sejteknek teljesen redukált folsavra van szükségük ahhoz, hogy lejátszódhassanak azok a biokémiai reakciók, melyek elengedhetetlenek a timidilátok és purinok *de novo* szintéziséhez (Stover, 2009). 5,10-Metilén-tetrahidrofolát kofaktorra van szükség a deoxiuridilát timidiláttá történő alakításához, melyet a timidilát-szintáz enzim végez. A 10-formil-tetrahidrofolát (mint formilcsoport-donor) jelenléte a purin bioszintézis szempontjából elengedhetetlen.

A MTX erősen, de reverzibilisen kötődő inhibitora célenzimének, a dihidrofolátreduktáznak (DHFR), mely a dihidrofolát (DHF) tetrahidrofoláttá (THF) redukálásáért felelős. Ezen útvonal gátlása a DHF felhalmozódásához, illetve a timidilát szintáz és a purin bioszintézis gátlásához vezet (Walling, 2006), ezáltal pedig gátlás alá kerül a DNS-szintézis és a sejtproliferáció (Fairbanks és mtsai., 1999).

Aktív metabolitja, a MTXglu a DHFR enzimen kívül gátolja a foszforibozil-glicinamid formiltranszferáz (GART) és az 5-aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotid formiltranszferáz (ATIC) enzimeket is (Walling, 2006; Allegra és mtsai. 1985).

Az ATIC-gátló hatás eredményeképpen a sejtekben megnő az 5-aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotid (AICAR) koncentrációja (Cronstein és mtsai., 1993). Az AICAR gátolja az AMP deamináz és adenozin deamináz enzimeket, ez pedig az adenin nukleotidok extracelluláris térbe való felszabadulásának serkentéséhez vezet. Az adenin nukleotidokat sejtfelszínen levő enzimek (pl. CD39, CD73) adenozinná alakítják (Cronstein és Aune, 2020). Az adenozin receptorok (A_{1a} , A_{2a} , A_{2b} , A_3) stimulációja szinte az összes, gyulladásos folyamatban résztvevő sejtípusra gátló hatást fejt ki. Egerekben a MTX által indukált adenozin-felszabadulás gyulladáscsökkentő hatása megszűnt szelektív A_{2a} receptor antagonista beadása után (Cronstein és mtsai., 1993). Artritiszes patkányokban a nemszelektív adenozin receptor antagonisták (teofillin és koffein) gátolták a MTX ízületi gyulladást csökkentő hatását (Montesinos és mtsai., 2000). A_{2a} -, A_3 - és CD73-deficiens egerekben a MTX nem fejtett ki gyulladáscsökkentő hatást (Montesinos és mtsai., 2003; Montesinos és mtsai., 2006). Újabb kutatások szerint az adenozin termelésének és felszabadulásának serkentése a regulátor T-sejtek működési mechanizmusai közé tartozhat. Ezen sejtek feladata a celluláris immunválasz csökkentése, ezáltal a gyulladásos folyamat gátlása (Cronstein és Sitkovsky, 2017).

A MTX gátolja az aktivált T-sejtek által indukált citokintermelést egészséges emberekben és RA-ben szenvedő betegekben is. Főleg az IL-4, IL-6, IL-13, TNF- α , interferon-gamma (IFN γ) és a granulocita-makrofág kolóniastimuláló faktor (GM-CSF) termelését gátolja (Gerards és mtsai., 2003; de Lathouder és mtsai., 2004). Azonban a monociták által termelt citokinek termelését a MTX alig befolyásolja (de Lathouder és mtsai., 2002).

Mivel a kardiovaszkuláris betegségeket (CVD-ket) is szisztemás gyulladásoknak tekinthetjük (ugyanúgy, mint pl. a RA-t), a betegségmódosító antireumatikus gyógyszerek kardiovaszkuláris kockázatra gyakorolt hatása az elmúlt évtizedben

intenzíven kutatott területté vált (Bartoloni és mtsai., 2018; Thanigaimani és mtsai., 2021; Lems és mtsai., 2021). Klinikai vizsgálatok során megfigyelték, hogy a MTX csökkenti a CVD-k kockázatát RA-ben szenvedő betegek esetében (Micha és mtsai., 2011, Choi és mtsai., 2002). Ezen hatás valószínűleg a MTX antioxidáns, gyökfogó tulajdonságának köszönhető. RA-es betegek szinoviális folyadékában, illetve ateroszklerotikus plakkokban is megtalálhatók bizonyos kovalensen módosult fehérjék, melyek serkentő hatást fejtenek ki a gyulladásos folyamatokra. Ezek a fehérjék a helyileg kialakuló oxidatív stressz és lipidperoxidáció miatt keletkeznek (Anderson és mtsai., 2014; Heinecke, 1998). Feltételezések szerint a MTX gyökfogó tulajdonsága minden betegségtípus (RA és CVD) esetén hozzájárul a hatás kialakulásához (Zimmerman és mtsai., 2017).

2.1.4. Mellékhatások és kivédési lehetőségeik

A MTX a gyorsan osztódó sejtekre fejti ki citotoxikus hatását. Emiatt nemcsak a kórosan osztódó, rosszindulatú daganatsejtek, hanem a szervezet saját fiziológiásan is gyorsan osztódó sejtjei is érzékenyek a hatására (pl. a csontvelő, a bőrhám és a nyálkahártya sejtjei). A klinikai gyakorlatban az 1970-es években terjedt el a plazma MTX koncentráció monitorozása és a leukovorin (más néven folinsav, a folsav teljesen redukált formája, a MTX kompetitív inhibitora) adagolás, ez előtt azonban a nagy dózisú MTX-kezelés mortalitása kb. 5% volt (Widemann és Adamson, 2006). Azóta ezen intézkedéseken kívül a nagy dózisú MTX-kezelések során kötelezővé vált a megfelelő mértékű hidrálás és a vizelet alkalisztálása. Ennek köszönhetően mára jelentősen csökkent a súlyos mellékhatások gyakorisága, azonban a MTX farmakokinetikájára jellemző nagy inter- és intraindividuális különbségek miatt még mindig előfordulhatnak (Widemann és Adamson, 2006; Schmiegelow, 2009).

Általánosságban elmondható, hogy a MTX mellékhatásai dózisfüggők. Minél alacsonyabb dózisban kapja a beteg a gyógyszert, illetve minél rövidebb ideig tart a terápia, annál kisebb esély van mellékhatások kialakulására, illetve a kialakult mellékhatások annál enyhébbek. A kezelt betegek kb. 60%-a észlel valamilyen mellékhatást, és a megjelent tanulmányok szerint 7-32%-uk szakítja meg a terápiát mellékhatás miatt (Ortiz és mtsai, 1998; Lopez-Olivo és mtsai., 2014, Lie és mtsai., 2012).

A gasztrointesztinális (GI) mellékhatások közé tartozik az émelygés, görcsök, hasmenés, fekélyek a gyomor-bélrendszer bármely pontján. Ezen tünetek általában nem

súlyosak és a terápia befejeztével hamar elmúlnak, de a beteg számára komoly kellemetlenséggel és az életminőség romlásával járhatnak. Ezzel szemben a MTX hepatotoxikus mellékhatását ritkán kíséri jellemző tünetek, de ha nem derül fény rá időben, visszafordíthatatlan májkárosodást okozhat (Ortiz és mtsai., 1998).

A gasztrointesztnális mukozitisz fájdalmas fekélyek formájában jelentkezhet a gasztrointesztnális rendszer teljes területén. Súlyos esetben opioid fájdalomcsillapítók adását indokolhatja, parenterális táplálást tehet szükségessé és akár halálos kimenetelű is lehet. Hátterében a gyorsan osztódó epiteliális sejtek károsodása áll. Leukovorin adagolásával hatékonyan megelőzhetők vagy jelentősen enyhíthetők a tünetek (Howard és mtsai., 2016).

A vesekárosító mellékhatást valószínűleg a MTX és metabolitjainak tubulusokban való kicsapódása okozza. A keletkező kristályok nefropátiát indukálnak, a kialakuló veseelégtelenség miatt pedig lassul a MTX eliminációja (hiszen normális esetben kb. 90%-a a vizelettel ürül a szervezetből), ami megnövekedett plazmakoncentrációt és súlyosabb mellékhatásokat eredményez (Widemann és Adamson, 2006). A vesekárosító mellékhatás kivédése érdekében fontos a megfelelő hidrálás és a vizelet legalább pH 7,0-n tartása, mert a MTX és metabolitjai savas kémhatású közegben rosszul oldódnak. Oldhatóságuk a pH 6,0-ról 7,0-ra növelése következtében kb. 5-8-szorosára nő (Widemann és mtsai., 2014).

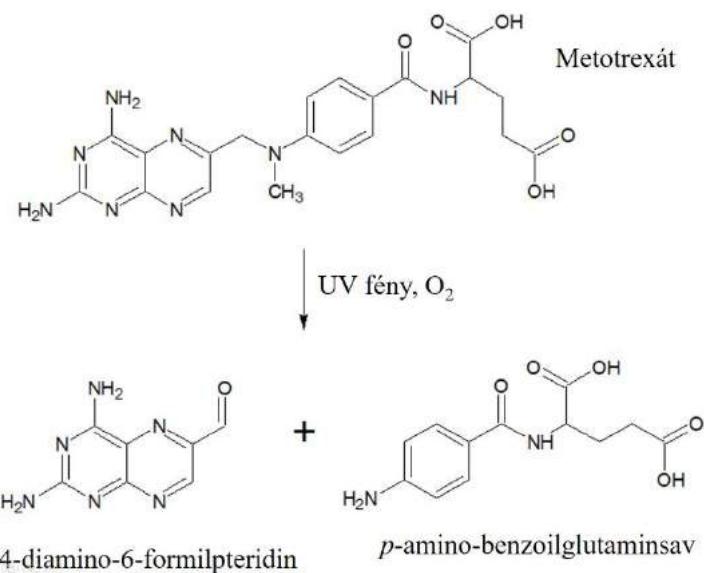
Ha a veseelégtelenség és a tartósan magas plazma MTX-koncentráció már kialakult, a leukovorin és a vizelet pH növelése már nem elegendő. Ebben az esetben rekombináns bakteriális karboxipeptidáz-G2 enzim segítségével a MTX az inaktív metabolitjává DAMPA-vá alakítható (Widemann és mtsai., 2014).

A betegek kb. 11%-a számol be központi idegrendszeri mellékhatásokról, melyek leggyakrabban fejfájás, zavartság, fáradtságérzés, görcsrohamok lehetnek. A háttérben leggyakrabban akut leukoencefalopátia áll, melynek tünetei a MTX beadása után 24 órán belül kialakulnak és az esetek többségében spontán, hosszútávú szövődmények nélkül elmúlnak. Kialakulásának okai nem ismertek, de gyakrabban fordul elő azokban a betegekben, akik a MTX-terápiát megelőzően, vagy azzal egyidejűleg sugárterápiában is részesülnek (Howard és mtsai., 2016; Pande és mtsai., 2006).

A fentiek alapján elmondhatjuk, hogy a MTX számos kórkép esetén elsőként választandó hatóanyag, azonban sokféle mellékhatást okozhat, melyeknek kivédésére kevés, és nem mindig használható lehetőségünk van. Ezért ez a vegyület jó célpontja a célzott terápiával foglalkozó kutatásoknak.

2.1.5. A MTX fényérzékenysége

A MTX fényérzékeny molekula, UV-fény hatására bomlik (fotodegradálódik). Fotodegradációs termékei a 2,4-diamino-6-formilpterin (DFP) és a *p*-amino-benzoilglutaminsav (ABGA) (**2. ábra**). A MTX fotodegradációját megfigyelték különböző oldószerekben és különböző fényforrásokat, illetve különböző besugárzási hullámhosszokat alkalmazva, azonban a fotodegradációs termékek tulajdonságairól és élettani hatásairól alig áll rendelkezésre adat a szakirodalomban (Pascu és mtsai., 2004; Sabry és mtsai., 2003).



2. ábra: A MTX fotodegradációja UV-besugárzás hatására (Pascu és mtsai., 2004).

2.2. A Phototrexate (PHX)

2.2.1. Fotofarmakológia

A fényérzékelés képessége számos élőlény alapvető tulajdonságai közé tartozik. Ezt a képességet a természetben csupán néhány vegyületcsoport biztosítja (pl. retinal, flavinok), melyek általában fehérjékhez kapcsolódnak. Ezek a molekulák ősi biokémiai útvonalak termékei, és hatékonyságuk miatt az evolúciós folyamatok során változatlanok maradtak. Közös tulajdonságuk, hogy fotokróm molekulák, ami azt jelenti, hogy bizonyos hullámhosszú fény hatására reverzibilisen izomerizálódnak, tehát fényérzékeny molekuláris kapcsolóként működnek (Broichhagen és mtsai., 2015).

Ezzel szemben szintetikus fényérzékeny molekuláris kapcsolók kevesebb, mint 100 éve léteznek, viszont számos ilyen molekulát sikerült már szintetizálni (pl. azobenzolok, sztilbénök, spiropiránok, diariletének) (Szymański és mtsai., 2013). Ezen molekuláknak, illetve molekularészeken köszönhetően megszületett, és az elmúlt évtizedben intenzíven kutatott területté vált a fotofarmakológia.

A fotofarmakológia célja szintetikus fényérzékeny molekuláris kapcsolók bioaktív molekulákhöz való (kovalens vagy nemkovalens) kapcsolása, ennek segítségével pedig ezen bioaktív molekulák fotokrómmá alakítása. Így a fotofarmakológiai hatóanyagok kettő vagy több stabil izomerrel rendelkeznek, melyek fény hatására (vagy fény hiányában) reverzibilisen átalakulhatnak egymásba, és biológiai hatásuk jelentősen eltérő (Broichhagen és mtsai., 2015).

Ez tehát azt jelenti, hogy a fotofarmakológia segítségével reverzibilisen aktiválható (ki-be kapcsolható) hatóanyagok hozhatók létre, mely tulajdonság jelentősen javíthatja számos betegség terápiájának mellékhatásprofilját.

Az azobenzolok a leggyakrabban alkalmazott és leginkább vizsgált szintetikus molekuláris kapcsolók (Hamon és mtsai., 2009), legfontosabb előnyeik, hogy könnyen előállíthatók, gyors fotoizomerizációra képesek, illetve alacsony kioltás és magas fotostacionárius állapot jellemző rájuk (ez a *cisz*- és *transz*-izomerek arányát jelenti, minél nagyobb, annál nagyobb arányban alakítható át az egyik izomer a másikba) (Renner és Moroder, 2006). Hátrányuk, hogy az izomerizációhoz UV-fény szükséges, mely korlátozza az *in vivo* alkalmazás lehetőségeit, hiszen az UV-fény nem hatol be a szövetekbe, viszont károsítja az élő sejteket. Erre megoldást jelenthetnek olyan, újfajta azobenzol származékok, melyek esetében a fotoizomerizációhoz nem szükséges UV-fény, az már látható fény hatására megtörténik (Siewertsen és mtsai., 2009).

A vegyületcsoportnak jellemzően két izomer formája van, a *cisz* és a *transz*, az előbbi termodinamikailag stabilabb, vagyis a *transz*-azobenzol származékok összenergiája mintegy 10 kJ/mol-al kisebb. A nemszubsztituált *transz*-azobenzol abszorpciós csúcsa 320 nm körül van, az ezen a hullámhosszon való elnyelés a N-N kötés rotációját és ezzel a *cisz* izomer kialakulását eredményezi. A *cisz* izomer visszaalakulása termikus úton is bekövetkezhet, vagy látható fénnyel történő besugárzás hatására (>460 nm) (Szymański és mtsai. 2013).

Számos olyan fotofarmakológiai molekulát sikerült már előállítani, melyek valamilyen receptor ligandjai (pl. G-protein-kapcsolt receptorok, ionotróp glutamát receptorok, feszültségfüggő ioncsatornák), így gyakorlatilag ezen receptorok működése fény által irányíthatóvá vált (Banghart és mtsai. 2009; Broichhagen és mtsai, 2015). Ez közvetlen módon is megvalósítható úgy, hogy az adott fehérjemolekulába (vagy más makromolekulába) olyan, módosított aminosavat építenek be, mely tartalmaz fényérzékeny molekuláris kapcsolót (Szymański és mtsai. 2013).

A fotofarmakológia tényerése különösen előnyös lenne a daganatellenes terápia esetén, hiszen az antineoplasztikus hatású kemoterápiás szerek sokféle mellékhatást okozhatnak, melyek gyakran súlyos tünetekkel járnak. Az előnytelen mellékhatásprofilal rendelkező hatóanyagok miatt több lehetséges megoldás is kifejlesztésre került, melyek célja a célzott daganatellenes terápia elérése (pl. célzott molekuláris terápia, hatóanyagszállító rendszerek), de ezek gyakorlati megvalósítása sokszor akadályokba ütközik (Saijo, 2012; Senapati és mtsai. 2018).

2.2.2. A fotofarmakológia daganatellenes alkalmazásának lehetőségei

A szakirodalomban több olyan közlemény is található, melyekben valamilyen fotofarmakológiai, tehát reverzibilis fotoizomerizációra képes citotoxikus molekulát írtak le. Ezeket ismert hatóanyagokból hozták létre úgy, hogy fényérzékeny molekuláris kapcsolót építettek a kiindulási molekulákba.

A gramicidin S antibiotikum diaril-etén csoportot tartalmazó származéka esetében a daganatellenes hatással rendelkező izomer látható fény hatására alakul ki, UV-fény hatására pedig átalakul a biológiaileg inaktív izomerré. Lewis tüdőkarcinómában szenvedő egerekben a fotofarmakológiai terápia növelte a túlélést nemcsak a kontrollhoz (az ebbe a csoportba tartozó egerek csak vivőanyagot kaptak), hanem a gramicidin S-hez képest is (Babii és mtsai. 2016).

Egy másik kutatócsoport komplexált platina(II) iont tartalmazó fotokróm molekulát hozott létre 1,2-ditieniletén csoport beépítésével. UV-fény hatására alakul ki az aktív, látható fény hatására pedig az inaktív izomer. DMS53 sejtvonalon egyértelmű volt a különbség a két izomer hatékonysága között, de az aktív formánál a ciszplatin jelentősen hatékonyabbnak bizonyult (Presa és mtsai. 2015).

A combretastatin A4 (CA4) a tubulin polimerizáció gátlója. Azobenzol csoportot tartalmazó származékával (azo-CA4, más néven Photostatin) lehetségesse válhat a mitózis gátlása *in vivo* akár egy darab sejtben is, a szomszédos sejtek osztódásának gátlása nélkül (Borowiak és mtsai. 2015).

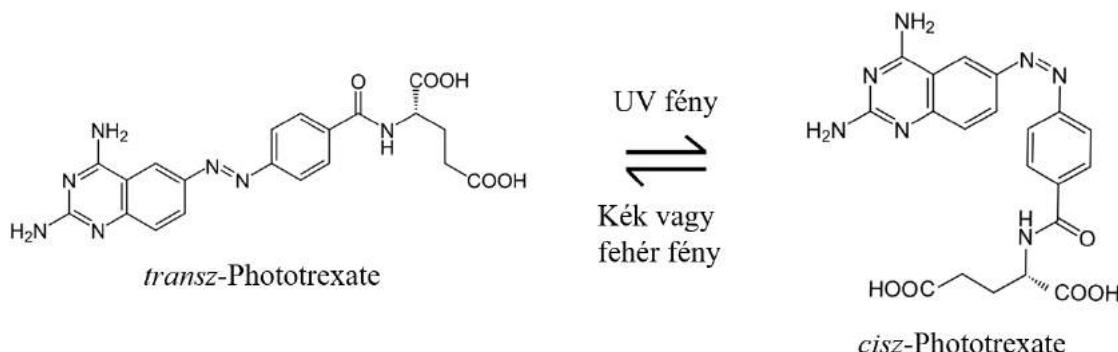
A metotrexát (MTX) fotokróm származékát, az azobenzol csoportot tartalmazó Phototrexate-ot (PHX) 2018-ban írta le először egy spanyol, illetve tőlük függetlenül 2019-ben egy japán kutatócsoport (ők azoMTX-nak nevezték el ezt az új molekulát) (Matera és mtsai. 2018; Mashita és mtsai. 2019).

A MTX több okból is megfelelő hatóanyag ahhoz, hogy fotofarmakológiai származékát előállítsuk: klinikai alkalmazásával kapcsolatban több évtizedes tapasztalat áll rendelkezésre; elsővonalbeli gyógyszermolekula viszonylag magas incidenciájú betegségek esetében; a szervezet olyan területein elhelyezkedő daganatok kezelésében is használják, melyek megvilágítása megoldható (pl. bőr, bélrendszer, húgyhólyag); súlyos mellékhatásokat okozhat, melyek korlátozhatják felhasználását (Matera és mtsai. 2018).

A hatóanyagok azobenzol csoportot tartalmazó származékainak előállítására kétféle módszer létezik: az „azo-extenzió” és az „azologizáció”. Előbbi esetben egyszerűen hozzákapcsolnak az eredeti molekulához egy fenilazo csoportot, egy olyan helyen, ahol várhatóan a hozzáadott csoport izomerizációja módosítani fogja a vegyület biológiai hatását (Huckvale és mtsai. 2016). Utóbbi esetben az eredeti molekula egy részét (pl. sztirol, N-fenil-benzamid) cserélik le azobenzolra (Schönberger és Trauner, 2014). Az „azologizáció” általában előnyösebb, mert így az új molekula farmakokinetikai és farmakodinámiai tulajdonságai nagymértékben megegyeznek az eredeti molekulával. Emiatt a PHX előállításához is az „azologizációt” alkalmazták. A PHX molekulában pteridin helyett kinazolin molekularész van, a metil-aminometilént pedig azocsoport váltja fel (**3. ábra**). Korábbi kutatások szerint az ilyen, illetve ezekhez hasonló szerkezeti módosítások nem csökkentik számottevően a MTX hatásosságát (Sirotnak és mtsai. 1984; Hynes és mtsai. 1988).

A *transz*- és *cisz*-PHX hatása közti különbséget az okozza, hogy a MTX csak úgy tud kapcsolódni célenziméhez, a DHFR-hoz, ha az aromás gyűrűket összekötő metil-

aminometilén molekularész „hajlított” konformációt vesz fel (Mastropaolo és mtsai. 1980), ez a konformáció szükséges a MTX és DHFR közötti hidrogénkötések kialakulásához. A PHX vonatkozásában az aromás gyűrűket azocsoport köti össze, mely a *cis*- izomer esetében a DHFR enzimmel kölcsönhatásban levő MTX alakjához hasonló konformációval rendelkezik. Azonban a *trans*-PHX esetében ez a molekularész nem a kölcsönhatás kialakulásához szükséges „hajlított”, hanem „nyújtott” konformációt vesz fel, ezért sokkal gyengébb enzimgátlásra képes, mint a *cis*-PHX vagy a MTX (Mashita és mtsai. 2019).



3. ábra: A Phototrexate (PHX) izomereinek szerkezeti képlete és a reverzibilis fotoizomerizáció

Mivel a PHX még viszonylag új molekulának számít, nagyon kevés adat áll rendelkezésre vele kapcsolatban a szakirodalomban. Leírták róla, hogy a gyakorlatban is jellemző rá a reverzibilis fotoizomerizáció. UV-fény hatására a *transz*-PHX kb. 10-15 perc alatt nagy arányban izomerizálódik *cisz*-PHX-tá, sötétben vagy látható fényben pedig termikus relaxációval visszaalakul a termodinamikailag stabilabb *transz* izomerré (a *cisz* izomer félélétideje 25°C-on kb. 5,5-11 óra, 37°C-on kb. 4 óra) és ez az oda-visszaalakulás sokszor megismételhető (Matera és mtsai. 2018; Mashita és mtsai. 2019).

A *transz*-PHX, *cisz*-PHX és MTX *Escherichia coli* dihidrofolát-reduktáz (eDHFR) enzimére gyakorolt gátló hatásának IC₅₀ értékekkel való összehasonlítása a következő eredményekkel járt: *transz*-PHX: 45±4 nM, *cisz*-PHX: 3,4±0,6 nM, MTX: 3,2±0,4 nM (Mashita és mtsai. 2019).

HeLa sejtvonalon végzett vizsgálat alapján (37°C, 24 óráig tartó inkubáció) a *transz*-PHX esetében 34 μM, a *cisz*-PHX esetében 6 nM IC₅₀ értéket mértek. Az utóbbi érték összefethető a MTX-tal, ami különösen azért figyelemre méltó eredmény, mert a vizsgálat 24 óráig tartott, a *cisz*-PHX félélétideje azonban ennél jelentősen rövidebb (Matera és mtsai. 2018).

Ezen vegyületek *in vivo* összehasonlítása is megtörtént zebradánió (*Danio rerio*) embriók alkalmazásával. Az embriók túlélési arányát és a fejlődési rendellenességek gyakoriságát vizsgálták. Az eredmények hasonlóak voltak a fent leírt vizsgálatokhoz: a *transz*-PHX a kontrollhoz képest alig okozott eltérést, míg a *cisz*-PHX és MTX jelentősen csökkentette a túlélési arányt, az életképes embrióknak pedig jelentős része rendelkezett valamilyen fejlődési rendellenességgel. Az *in situ* *transz*-PHX-ból létrehozott *cisz*-PHX hatása nem különbözött a vizsgálat előtt létrehozott *cisz*-PHX-tól (Matera és mtsai. 2018).

2.3. A humán szérum albumin (HSA)

2.3.1. A HSA tulajdonságai

Az albumin neve a latin „albus” (fehér) szóból származik, ami a főtt tojás sárgáját körülvevő, fehér színű részre utal (Fanali és mtsai., 2012). A humán szérum albumin (HSA) a vérplazmában legnagyobb koncentrációban (kb. 700 μM) megtalálható fehérjemolekula, egészséges felnőttekben a plazma teljes fehérjetartalmának 50%-át teszi ki. Egyetlen, nem glikozilált polipeptid láncból áll, tömege pedig 66,5 kDa. 585 aminosav alkotja, és 17 diszulfid hidat tartalmaz. Átmérője 36 Å (Clavant és Comper, 2003). Három doménből épül fel (I, II, III), melyek mindegyike további kettő aldoménre (A, B) osztható. minden egyes domén 10 α -hélix láncból áll, ebből az A aldomének 6, a B aldomének pedig 4 (Fanali és mtsai., 2012) α -hélixet tartalmaznak. A domének egymáshoz képest elmozdulhatnak. A molekula krisztallográfiás képe szív alakú, de oldatban ellipszoid formát vesz fel. A gyors és nagymértékű konformációváltozásra való képessége miatt különösen alkalmas számos endogén és exogén molekula megkötésére (Rozga és mtsai., 2013).

A HSA szintézise a májban, a hepatociták endoplazmatikus retikulumának felszínén zajlik. A fehérjét kódoló gén a 4-es kromoszómán található. Egészséges felnőttekben napi 12-25 g HSA szintetizálódik. A megfelelő mennyiséggű HSA termelésének több feltétele van, ezek közé tartozik az mRNS és aminosavak rendelkezésre állása, a riboszómák jelenléte és az elegendő energia (ATP és/vagy GTP formájában), illetve a hormonális állapot (pl. inzulin jelenléte) is fontos szerepet játszik (Nicholson és mtsai., 2000). A HSA gyakorlatilag nem raktározódik a májban, de szükség esetén a hepatociták a termelést akár 200-300%-kal is meg tudják növelni (Garcovich és mtsai., 2009). Életideje 18-36 nap közé tehető (Fanali és mtsai., 2012).

2.3.2. A HSA funkciói

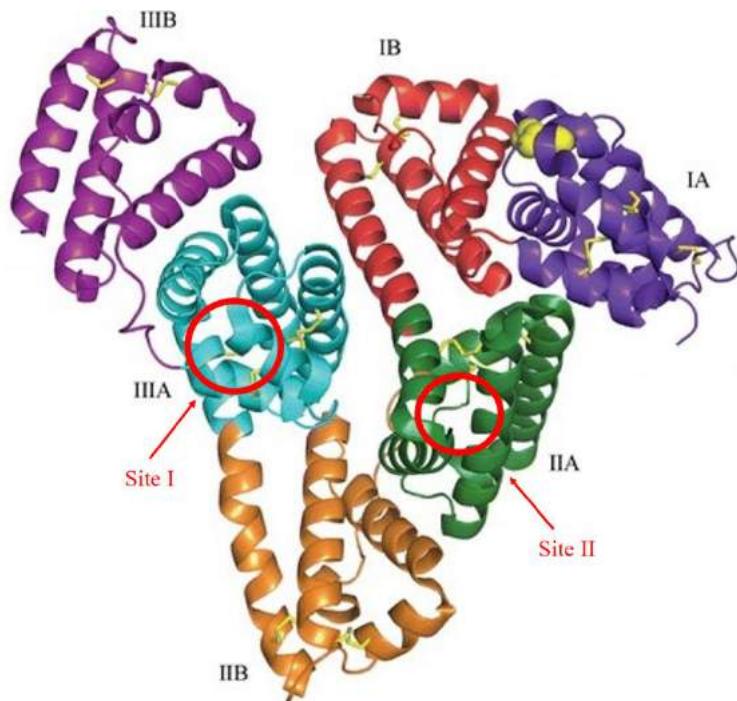
Kis tömege (66,5 kDa a plazma globulinok átlagosan 147 kDa tömegéhez képest) ellenére az albumin felelős a vérplazma onkotikus nyomásának 80%-áért. Ennek oka a többi plazmaférjéhez képest rendkívül nagy koncentrációja, illetve a negatív töltése, ami segít az intravaszkuláris térben tartani a kisebb méretű, pozitív töltésű ionokat (pl. Na^+), ezáltal közvetve a vizet is. (Nicholson és mtsai., 2000).

Tiol (-SH) csoportjainak köszönhetően a HSA antioxidáns hatással rendelkezik. Képes reagálni a neutrofil granulociták által felszabadított szabad gyökökkel, ezáltal részt vesz

a gyulladásos reakció szabályozásában (Kouoh és mtsai., 1999). Enzimatikus aktivitása (pl. észteráz, foszfatáz, enoláz) révén metabolikus funkciókkal is bír: fontos szerepet játszik a pl. a diszulfiram és egyes antibiotikumok eliminációjában. Az endogén vegyületek közül a lipidek és az eikozanoidok eliminációjában játszik fontos szerepet (Nicholson és mtsai., 2000; Kragh-Hansen és mtsai., 2002).

Számos endogén és exogén molekulát képes nagy affinitással megkötni (a kötési állandók gyakran a 10^{-4} - 10^{-6} tartományban vannak), ezáltal a vérkeringésben szállítani és raktározni (Kragh-Hansen és mtsai., 2002). Ez a klinikai gyakorlatban fontos jelenség, hiszen egyes gyógyszerek a vérplazmában akár 95%-nál is nagyobb arányban kötődhetnek reverzibilisen a HSA-hoz (pl. warfarin, ketoprofén) (Li és mtsai., 2014; Chuang és mtsai., 1999). A nagyarányú HSA-val való kölcsönhatás a terápiás hatást csökkenti, illetve időben elnyújtja, hiszen a HSA a hozzá kötődő molekulák számára raktárként működik (depot hatás) és biológiai aktivitással csak a szabad, nem kötött állapotban levő gyógyszermolekulák rendelkeznek.

A HSA több kötőhellyel is rendelkezik, azonban a korlátozott számú, viszonylag erős kölcsönhatás kialakítására képes kötőhelyek korlátozott száma és a HSA flexibilitása azt eredményezi, hogy egy molekula kötődése nagymértékben befolyásolhatja a további molekulák kötődését (Kragh-Hansen és mtsai., 2002). Ezt leszorításos interakciónak hívjuk, melynek két fajtája a kompetitív, illetve az allosztérikus leszorítás. Kompetitív leszorítás esetén az adott kötőhelyért versengő kismolekulák kötődését a kötődési affinitásuk és az egymáshoz viszonyított koncentrációjuk határozza meg. Allosztérikus leszorítás esetén a versengő kismolekulák kötőhelyei máshol helyezkednek el, azonban az egyik molekula kötődése hatására egy (vagy több) másik kötőhely konformációja megváltozik, ezáltal gyengül az ezen kötőhelyekkel kölcsönható molekulák kötődése (Otagiri, 2005). A két legfontosabb kötőhely a Sudlow's Site I és a Sudlow's Site II (Sudlow és mtsai., 1975), melyeket röviden Site I-nek, illetve Site II-nek is neveznek, és a HSA IIA, illetve IIIA aldoménjein helyezkednek el (**4. ábra**).



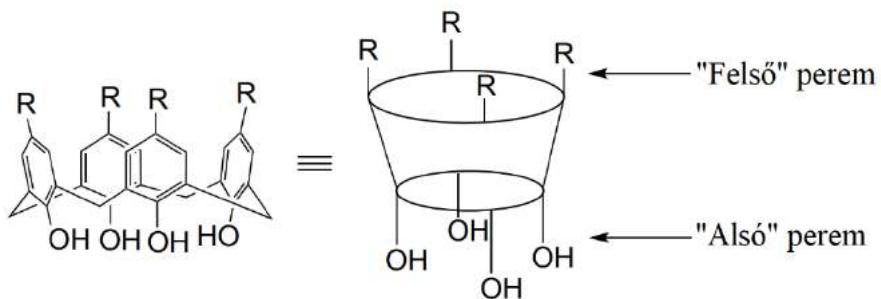
4. ábra: A humán szérum albumin szerkezete és legfontosabb kötőhelyei (Larsen és mtsai., 2016).

A Site I kötőhelyhez jellemzően kapcsolódó molekulák a dikarbonsavak és a nagyméretű, negatív töltéssel rendelkező heterociklusos molekulák (Kragh-Hansen és mtsai., 2002). A Site I flexibilis és nagyméretű, egyszerre több molekula befogadására is képes (Yamasaki és mtsai., 1996). Nagy méretéből és a lehetséges ligandumainak sokszínűségeből következik, hogy valószínűleg több különböző, de egymással átfedésben levő, kisebb kötőhelyből áll (Fehske és mtsa., 1982). Az ehhez a kötőhelyhez kapcsolódó legfontosabb gyógyszerhatóanyagok például a warfarin, a fenilbutazon, az indometacin és a furoszemid (Kragh-Hansen és mtsai., 2002). A Site II kisebb, szűkebb és kevésbé flexibilis, mint a Site I, valamint nagymértékű sztereoszelektivitás jellemzi (pl. az L-triptofán 100-szor nagyobb affinitással kötődik hozzá, mint a D-triptofán). Ezen kötőhely jellemző ligandumai egyszeres negatív töltéssel rendelkező, kisméretű aromás karbonsavak, melyekben a negatív töltés a molekula hidrofób központi részétől viszonylag távol helyezkedik el (Kragh-Hansen és mtsai., 2002; McMenamey és Oncley, 1958).

2.4. Kalixarének, rezorcinarén-alapú kavitandok

Az elmúlt években számos tanulmány foglalkozott a makrociklusos komplexképző molekulák célzott gyógyszeres terápiában való alkalmazásában rejlő lehetőségek felderítésével (Fahmy és mtsai., 2019). Ezek a komplexképzők a természetben előforduló fehérjemolekulák kötőhelyeit utánozva, üreges szerkezetük által képesek másodlagos kémiai kötést kialakítani más endogén vagy exogén anyagokkal, azaz befogadni őket apoláris üregükbe (Petroselli és mtsai, 2021).

A kalixarének egy makrociklusos vegyületcsalád, melynek tagjait alkilcsoporttal para-helyzetben szubsztituált fenolszármazék és formaldehyd kondenzációs reakciójával állíthatjuk elő. Az aromás gyűrűket metilén hidak kötik össze. Így egy viszonylag flexibilis szerkezetű, üreges, kosár alakú molekulát kapunk (**5. ábra**). A vegyületcsalád neve is alakjára utal, a görög „kálux” (csésze, kehely) szóból származik (Moss és mtsai., 1995). A „kalix” és „arén” szavak közé illesztett, szögletes zárójelben levő szám a gyűrűtagszámnak felel meg (pl. a kalix[4]arén molekulában a ciklusos oligomert felépítő aromás gyűrűk száma 4).



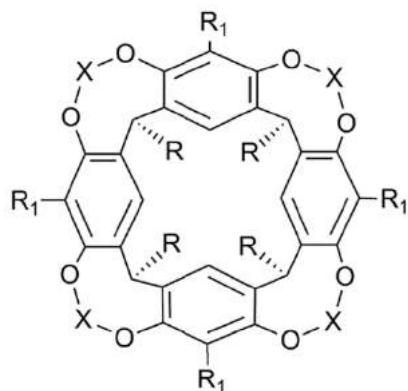
5. ábra: Kalix[4]arén általános szerkezete.

A kalixarének szerkezete, illetve a széleskörű származékképzési lehetőségek különösen alkalmassá teszik őket a gyógyszermolekulák szállítására, a hatás helyére való eljuttatására, gazda-vendég típusú kölcsönhatások kialakítása által. A „felső” peremen a fenolos hidroxilcsoportot képest *para* helyzetben számos fajta funkcionális csoport kapcsolható (pl. karboxilát, foszfát, ammónium) (Neda és mtsai, 1998), ezáltal a különböző oldószerekben való oldhatóság befolyásolható (Nimse és Kim, 2013; Guo és Liu, 2014). Az üreg apoláris, az alsó peremen pedig hidroxilcsoportok vannak.

A „kavitand” szót Donald J. Cram használta először (az angol „cavity” szóból, melynek jelentése „üreg”) (Cram, 1983). Ő a rezorcinarén-alapú befogadómolekulákat értette ezen kifejezés alatt, azonban tágabb értelemben minden olyan vegyületet így

nevezünk, melyek rendelkeznek olyan, megfelelő méretű üreggel, melybe egyszerű molekulák vagy ionok komplexálódhatnak.

A rezorcinarén-alapú kavitandok (a továbbiakban csak kavitandok) a kalixarén vegyületcsaládból származnak. Fontos különbség a két csoport tagjai között az, hogy a kavitandok merevebb szerkezzel rendelkeznek, amit az okoz, hogy alapvázuk az alsó és felső peremen is egymáshoz rögzített aromás szegmensekből áll (**6. ábra**).



6. ábra Rezorcinarén-alapú kavitand általános szerkezete. X: az aromás gyűrűtagokat a felső peremen összekötő csoport; R₁: a felső permhez kapcsolt szubsztituens; R: az alsó peremhez kapcsolt szubsztituens.

A kavitandokra szintén jellemző, hogy változatos módon funkcionálthatók, ezáltal pedig a belső üreg mérete és az adott molekula fizikai-kémiai tulajdonságai az aktuális céloknak megfelelően változtathatók.

A kavitandok potenciálisan számos területen hasznosak lehetnek, alkalmasak pl. gyógyszerszállító rendszerek kialakítására (Sherman, 2003) és különböző reaktív intermedierek stabilizálására, valamint szelektív érzékelésére (Liu és mtsai, 2014).

3. 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 HSA stabilitására.
- A MTX és PHX kavitandszármazékokkal való kölcsönhatásának termodinamikai jellemzése.
- A MTX és PHX antioxidáns tulajdonságainak vizsgálata és összehasonlítása több különböző módszer alkalmazásával.

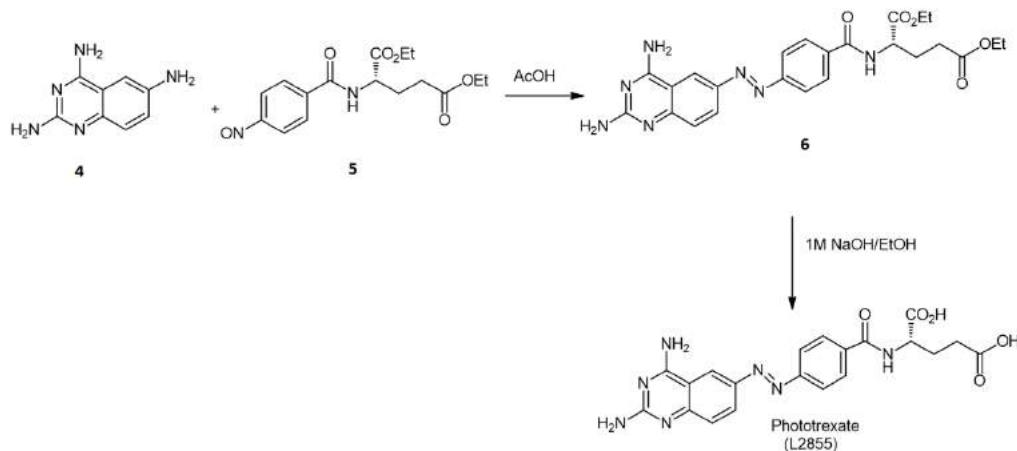
4. Anyagok és módszerek

4.1. Reagensek

A mérések során felhasznált reagensek, vegyszerek és oldószerek minden esetben analitikai vagy spektroszkópiai minőségűek voltak. A metotrexátot (MTX), humán szérum albumint (HSA), dimetil-szulfoxidot (DMSO), xantin-oxidáz enzimet (XO), hipoxantint (HX), és az 1-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-piperidin-4-olt (N-hidroxi-TEMPOL) a Sigma-Aldrich Kft-től (Saint Louis, MO, Amerikai Egyesült Államok) vásároltuk. A különböző pufferoldatok előállításához szükséges sókat és egyéb vegyszereket a VWR Kft-tól (Budapest, Magyarország) szereztük be. A tetrakis(androszt-4-én-3-on-17 α -etinil)-kavitand (TAC) és a tetrakis(3,5-dikarboxilátofenoxy)-kavitand (TDC) szintézise a PTE TTK Általános és Szervetlen Kémia Tanszékén, a Phototrexate (PHX) szintézise pedig a PTE GYTK Szerves és Gyógyszerkémiai Intézetében történt.

4.2. A PHX szintézise

A szintézist a szakirodalomban leírtak szerint végeztük (Matera és mtsai., 2018, 7. ábra).



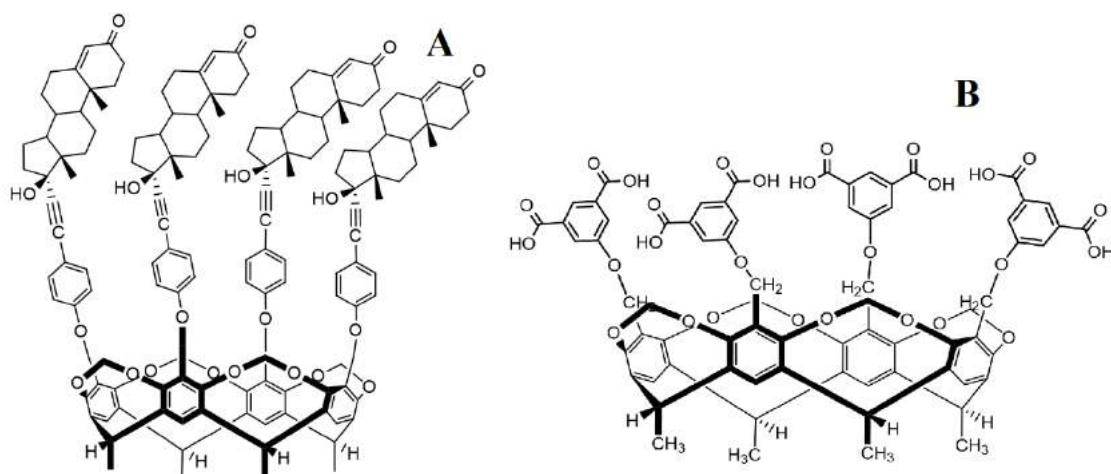
7. ábra: A PHX szintézise, vázlatosan összefoglalva.

Röviden összefoglalva, a kinazolin-2,4,6-triamint (**4**) hozzákapcsoltuk a (S)-dietil-(4-nitrozobenzamido)-pentándioáthoz (**5**) és így megkaptuk a **6**-ot, melyet hidrolizáltunk nátrium-hidroxid és etanol elegyében, így megkaptuk a PHX-ot.

Kromatografiás tisztítás után a PHX fizikai kémiai tulajdonságai megegyeztek a korábban publikáltakkal.

4.3. Kavitandszármazékok szintézise

Kutatásunk során kétféle üreges szerkezetű, makrociklusos befogadó (komplexképző) molekulát használtunk, a tetrakis(androszt-4-én-3-on-17 α -etinil)-kavitandot (TAC) és a tetrakis(3,5-dikarboxilátofenoxy)-kavitandot (TDC) (**8. ábra**). Ezek szintézise a PTE TTK Általános és Szervetlen Kémia Tanszékén történt, a korábban közzétett szintetikus módszerek szerint (Nagymihály és mtsai., 2020; Csók és mtsai., 2011).



8. ábra: A kutatásaink során használt, TAC (A) és TDC (B) nevű kavitandszármazékok szerkezete.

4.4. Műszerek

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.

A fluorimetriás méréseket Fluorolog τ3 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, zárhozó kvárc kuvettákat használtunk.

A HSA hődenaturációját differenciál pásztázó kalorimetriás módszerrel (μ SC, Setaram, Lyon, Franciaország) mértük, az adatok kiértékelését pedig Calisto Thermal Analysis Software (Setaram Instrumentation, Lyon, Franciaország) programmal végeztük.

Az EPR spektroszkópiai mérésekhez MiniScope MS 200 (Magnetech, Berlin, Németország) műszert használtunk, az adatok kiértékelését pedig MiniScopeCtrl programmal végeztük.

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

A mérésekhez phosphate buffered saline (PBS, pH 7,4, NaCl: 137 mM; KCl: 2,7 mM; NaH₂PO₄: 8 mM; K₂HPO₄: 1,5 mM) puffert alkalmaztunk. Az 1 mM koncentrációjú MTX törzsoldatokat felhasználásig 4 °C-on, fénytől védve tároltuk, a szintén 1 mM koncentrációjú HSA-törzsoldatokat pedig közvetlenül a mérések előtt készítettük.

A MTX fotodegradációjának időbeli nyomonkövetését fluoreszcenciás módszerrel, az egyik termék fluoreszcenciájának mérésével végeztük. A fotodegradáció előidézéséhez a fluoreszcencia méréséhez alkalmazott 302 nm-es hullámhosszúságú fényt használtuk. Az adatok elemzése során az emissziós spektrum 351 nm-es és 458 nm-es csúcsait vizsgáltuk. A mérések izoterm körülmények között, 298 K-en történtek.

A másodlagos kölcsönhatások termodinamikai paramétereinek meghatározásához szintén fluorimetriás méréseket alkalmaztunk, 371 nm-es gerjesztési hullámhosszal, a 455 nm-es emissziós csúcsmagasságot vizsgálva. A mintákban a HSA koncentrációja állandó (1 μ M), a MTX, illetve fotodegradációs termékeinek (DFP és ABGA) koncentrációja pedig változó (0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 μ M) volt. minden mérést elvégeztünk 288 K, 293 K, 298 K, 303 K és 308 K hőmérsékleteken is.

A HSA hődenaturációjának kinetikáját kalorimetriás (DSC) módszerrel vizsgáltuk, 293 K és 373 K között. A referenciát és a mintát tartalmazó küvettába is 500-500 μ l oldatot töltöttünk, referenciaként az oldószert (PBS) használtuk. Háromfélé mintát mértünk: csak HSA-t tartalmazó oldatot, HSA-t és MTX-ot tartalmazó oldatot, illetve HSA-t és a MTX fotodegradációs termékeit tartalmazó oldatot. A vizsgált anyagok koncentrációja állandó, 450 μ M volt. minden mérést elvégeztünk 0,5 K/min, 0,8 K/min, 1 K/min és 1,2 K/min felfűtési sebességek alkalmazásával.

A vizsgált kölcsönhatások erősségeit (a kötési állandókat, K) a Benesi-Hildebrand egyenlet grafikus alkalmazásával határoztuk meg, a fluorimetriás mérések eredményei alapján:

$$\frac{1}{I-I_0} = \frac{1}{[MTX]} + \frac{1}{[MTX]*[HSA]*K} \quad (1)$$

ahol I_0 és I a HSA-t tartalmazó oldat emissziós intenzitása MTX (vagy a MTX fotodegradációs termékei) nélkül, illetve annak jelenlétében.

A fenti egyenletből számolt kötési állandók ismeretében a van 't Hoff egyenlet segítségével kiszámoltuk a vizsgált másodlagos kölcsönhatások szabadentalpia-, entalpia- és entrópiaváltozását:

$$\ln K = -\frac{\Delta G}{RT} = \frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (2)$$

ahol $\ln K$ a kötési állandó természetes alapú logaritmusa, ΔG a szabadentalpia-változás, ΔH az entalpiaváltozás, ΔS az entrópiaváltozás, R az egyetemes gázállandó, T pedig a hőmérséklet.

A kalorimetriás mérések eredményei alapján, a Kissinger-módszer segítségével határoztuk meg a HSA hődenaturációjának aktiválási energiáját (Kissinger, 1957):

$$\ln \left(\frac{H_r}{RT_{max}^2} \right) = - \left(\frac{E_a}{RT_{max}} \right) + \ln \left(\frac{R \cdot A}{E_a} \right) \quad (3)$$

ahol H_r a műszer felfűtési sebessége, T_{max} a denaturációs hőmérséklet, E_a az aktiválási energia, A pedig az arrheniusi preexponenciális tényező. Ha az egyenlet bal oldalát ábrázoljuk I/T függvényében, akkor (elsőrendű reakciókinetika esetén) egyenest kapunk, melyből az alábbi egyenlet segítségével határozható meg az E_a :

$$E_a = -R \cdot m \quad (4)$$

ahol m az egyenes meredeksége.

4.6. MTX és PHX kavitandszármazékokkal való kölcsönhatása

A MTX-nak TAC-dal, illetve a *transz*- és *cisz*-PHX-nak TAC-dal és TDC-dal való kölcsönhatásait vizsgáltuk fluorimetriás módszerrel. Oldószerként DMSO-ot használtunk.

A MTX-TAC kölcsönhatás vizsgálatához 390 nm-es gerjesztési hullámhosszt alkalmaztunk, az emissziós spektrumnak pedig az 540 nm-en megjelenő csúcsát vettük figyelembe az adatok kiértékelése során. A vizsgált mintákban a MTX koncentrációja állandó ($10 \mu\text{M}$), a TAC koncentrációja pedig változó ($0-80 \mu\text{M}$) volt. minden minta

emissziós spektrumát felvettük 293,0 K, 296,3 K, 299,7 K, 303,0 K, 306,3 K, 309,7 K és 313,0 K hőmérsékleteken.

A *transz*- és *cisz*-PHX TAC-dal és TDC-dal való kölcsönhatás vizsgálatához 366 nm-es gerjesztési hullámhosszt alkalmaztunk, az emissziós spektrumnak pedig a 490 nm-en megjelenő csúcsát vettük figyelembe az adatok kiértékelése során. A mintákban a *transz*-, illetve *cisz*-PHX koncentrációja állandó ($50 \mu\text{M}$), a kavitandszármazékok koncentrációja pedig változó ($0\text{-}450 \mu\text{M}$) volt. minden minta emissziós spektrumát felvettük 293 K, 298 K, 303 K és 308 K hőmérsékleteken.

A PTE GYTK Szerves és Gyógyszerkémiai Intézetében szintetizált *transz*-PHX izomerizációját UV-besugárzással végeztük ($\lambda=366 \text{ nm}$), melyhez egy Flotest 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 egyes komplexek kötési állandóit, illetve a kölcsönhatások termodinamikai paramétereit a Benesi-Hildebrand, illetve a van 't Hoff egyenletek segítségével határoztuk meg.

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

XO esszét alkalmaztunk HX szubsztráttal abból a célból, hogy összehasonlítsuk a MTX és PHX szuperoxid gyökfogó tulajdonságát.

Oldószerként Krebs-HEPES EPR puffert használtunk, mely a következő anyagokból állt: NaCl (99 mM), KCl (4,69 mM), CaCl₂ (2,5 mM), MgSO₄ (1,2 mM), NaHCO₃ (25 mM), KH₂PO₄ (1,03 mM), D-glükóz (5,6 mM), HEPES (20 mM), nátrium-dietil-ditio-karbamát (DETC, 5 μM) és deferoxamin (25 μM) (Rosenbaugh és mtsai., 2010).

A XO a HX-t két lépésben (HX → xantin → húgysav) oxidálja, a reakció során pedig szuperoxid gyök is keletkezik.

A méréseket EPR spektroszkópiás módszerrel végeztük. Spincsapdaként 1-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-piperidin-4-olt (N-hidroxi-TEMPOL) használtunk. Az N-hidroxi-TEMPOL a gyűrűs hidroxilamin-származékok közé tartozik, melyeket gyakran használnak spincsapdaként (Baćić és mtsai., 2016). Könnyen oxidálódnak, az így képződő stabil nitroxidok pedig EPR spektroszkópiával detektálhatóak (Dikalov és mtsai., 2018).

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. A mérések szobahőmérsékleten történtek.

A *transz*-PHX *cisz*-PHX-tá való átalakítását a fent leírtakhoz hasonlóan végeztük, de a mérések hossza miatt (az utolsó mintát 24 órával az oldatok elkészítése után vettük) a *cisz*-PHX-ot tartalmazó oldatokat folyamatosan megvilágítottuk UV-lámpával, így biztosítva, hogy teljes mértékben csak a *cisz* izomer legyen jelen.

Minden egyes minta esetében átlagoltuk a kapott EPR jelek amplitúdóit, és ezeket az amplitúdóértékeket ábrázoltuk az idő függvényében. Felhasználva, hogy az EPR jel amplitúdója arányos a mintában lévő párosítatlan elektronok számával (Dikalov és mtsai., 2007), az előzőekben leírt mérési pontokra görbét illesztve meghatároztuk a szabad gyökök termelődésének sebességi együtthatóját.

4.8. ABTS esszé

Ez a módszer alkalmas különböző vegyületek antioxidáns hatásának összehasonlítására. A 2,2'-azino-bisz-3-etilbenzotiazolin-6-szulfonsav kation gyök ($ABTS^{\bullet+}$) előállításához kálium-perszulfátot használtunk. A reakcióeleget fénytől elzárva, szobahőmérsékleten tartottuk. 16 óra múlva színes oldatot kaptunk, melynek 734 nm-en tapasztalható abszorpciós maximuma jól alkalmazható az antioxidáns anyag és $ABTS^{\bullet+}$ közötti reakció monitorozására.

A törzsoldatban az $ABTS^{\bullet+}$ 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 μ M, 7,5 μ M, 10 μ M, 12,5 μ M). Mérés előtt a mintákat 6 percig 37 °C-on inkubáltuk.

A Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilkromán-2-karbonsav) az E-vitamin vízoldékony analógja, antioxidáns kapacitás mérések széles körben elterjedt kalibrálószere. A vizsgált vegyületek (esetünkben MTX, *transz*-PHX, *cisz*-PHX) koncentráció-hatás görbéjének meredekségét elosztva a Troloxéval megkapjuk a TEAC-értéket (Trolox ekvivalens antioxidáns kapacitás).

4.9. Számítógépes modellezés

A kavitandok 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 jellegeit szántunk, az egyensúlyi konformációkat, valamint az entrópia meghatározásához szükséges rezgési-rotációs analízist is szemiempirikus AM1 módszerrel végeztük. A termodinamikai paraméterek (entalpia, entrópia és szabadentalpia) komplexképződés során bekövetkező változásait úgy számítottuk ki, hogy az adott paraméter termékekre (itt a komplexekre) számított értékeiből kivontuk a reaktánsokra (itt a befogadó és vendég molekulákra) számított értékeit. A rezgési entrópia járulékait a rezgési frekvenciák harmonikus approximációval történő kiszámítása után a következő egyenlet segítségével kaptuk meg:

$$S_{vib} = R \sum_i \left\{ \frac{\frac{h\nu_i}{kT}}{e^{\frac{h\nu_i}{kT}} - 1} - \ln[1 - e^{\left(-\frac{h\nu_i}{kT}\right)}] \right\} \quad (5)$$

ahol ν_i a rezgés frekvenciája, T az abszolút hőmérséklet, k a Boltzmann-, h a Planck-féle állandó. Egyes esetekben az oldószer figyelembe vételére a HyperChem programba implementált TIP3P dobozmodellt alkalmaztuk.

4.10. Statisztika

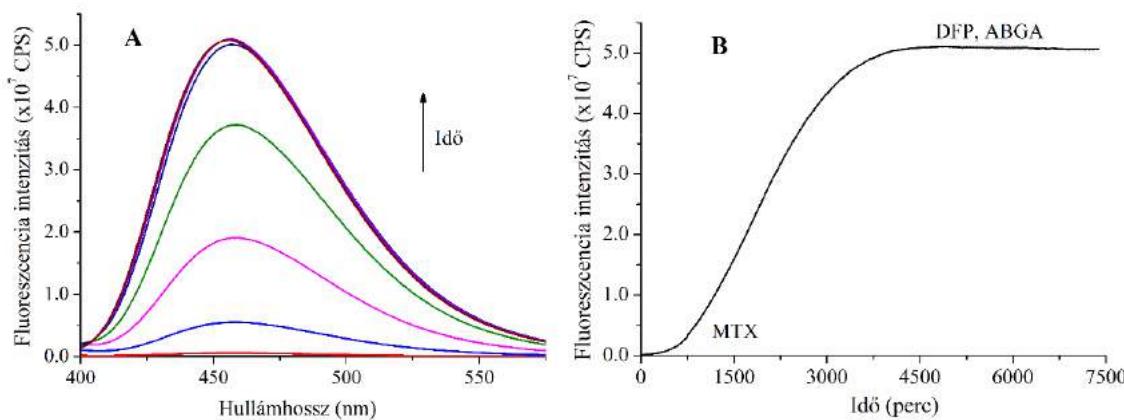
Az ábrák és táblázatok minimum három párhuzamos mérésből származó eredmény átlagát és a hozzájuk tartozó standard hibát (SEM) mutatják be. A statisztikai értékelések one-way ANOVA tesztettel történtek, OriginLab 8.1 program használatával (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA; $p < 0,05$).

5. Eredmények

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

5.1.1. A MTX fotodegradációja

Tekintettel arra, hogy célunk a MTX, illetve fotodegradációs termékeinek (DFP és ABGA) a HSA hődenaturációjára gyakorolt hatásának vizsgálata volt, első lépésként elő kellett állítanunk a fotodegradációs termékeket, azaz a MTX folyamatos besugárzásával el kellett érnünk annak teljes fotodegradációját. A MTX UV-fény, például 302 nm-es fényel történő besugárzás hatására bomlik, ugyanakkor a bomlástermékek a 302 nm-es gerjesztés hatására jelentős fluoreszcenciát mutatnak. Emiatt az 1 mM koncentrációjú MTX-oldatot 302 nm-es hullámhosszú fényel világítottuk meg (gerjesztési hullámhossz, λ_{ex}), 298 K hőmérsékleten. Az oldószer pH 7,4-es PBS volt. A bevilágítás következtében egyre nagyobb mennyiségben megjelenő bomlástermékek fluoreszcenciája miatt egy széles emissziós sáv jelent meg 458 nm-es maximummmal. A reakció nyomonkövetéséhez ezt a növekedő intenzitást mutató 458 nm-es emissziós csúcsot használtuk (**9. ábra**). Ennek a csúcsnak az intenzitása kb. 4000 perc után már nem változott tovább, ezért arra a következtetésre jutottunk, hogy a MTX az UV-fény hatására teljes mértékben lebomlott.



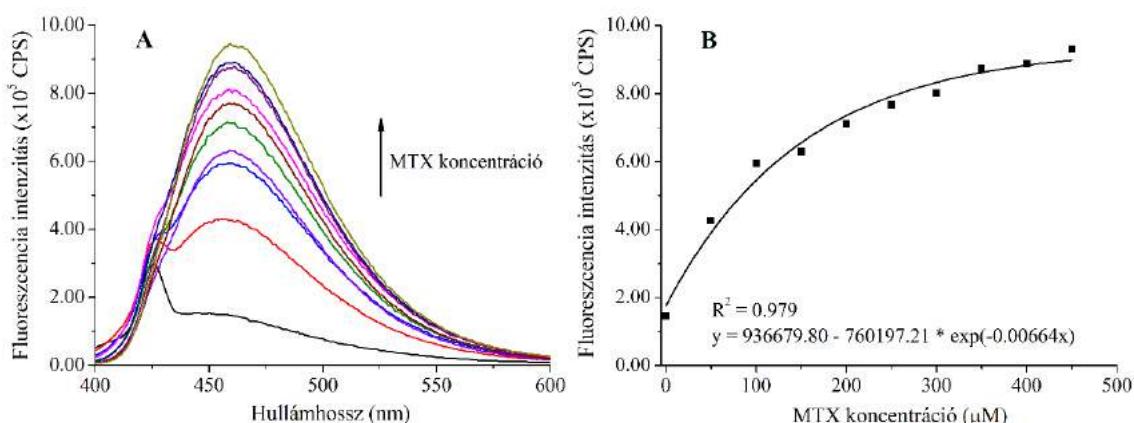
9. ábra: (A) MTX-oldat (1 mM) emissziós spektrumai az idő előrehaladtával ($\lambda_{ex}=302$ nm). (B) A 458 nm-es emissziós csúcs intenzitása az idő függvényében.

5.1.2. A HSA-MTX komplexképződés termodinamikája

További fluorimetriás mérésekkel azt tanulmányoztuk, hogy a MTX, illetve fotodegradációs termékei milyen erősséggű másodlagos kölcsönhatást alakítanak ki HSA-nal, és hogy ezen kölcsönhatások mennyire függnek a hőmérséklettől.

Állandó HSA koncentráció mellett, a MTX, illetve a fotodegradációs termékeinek hiányában, valamint ezek különböző koncentrációinak jelenlétében, különböző hőmérsékleteken végeztük a méréseket. A 455 nm-es, emelkedő intenzitást mutató csúcsot vizsgáltuk, mert jól elkülönül a csak HSA-t, illetve más reagenst alacsony koncentrációban tartalmazó mintákban 425 nm-en jól látható csúcstól, ami az oldószer (víz) Raman szórásából származik. Ez a Raman-szórás az egymással hidrogénkötéseket képező vízmolekulákból álló klaszterek OH rezgéseihez rendelhető, e rezgések második felharmonikusa.

A **10. ábrán** láthatók a HSA-MTX kölcsönhatás 298 K hőmérsékleten történt mérésének eredményei.



10. ábra: (A) 1 μM HSA-t tartalmazó minta emissziós spektrumai MTX jelenléte nélkül, illetve emelkedő MTX koncentráció mellett (0-500 μM , $\lambda_{\text{ex}}=302$ nm, 298 K). (B) A 455 nm-es emissziós csúcs intenzitása a MTX koncentrációjának függvényében.

A Benesi-Hildebrand egyenlet (**1. egyenlet**) segítségével kiszámoltuk a kölcsönhatásokhoz rendelhető kötési állandók (K, dm^3/mol) tízes alapú logaritmusait, melyeket az **1. táblázatban** tüntettünk fel.

Hőmérséklet (K)	MTX-HSA log K	Fotodegradált MTX-HSA log K
288	3,91±0,63	3,74±0,49
293	4,01±0,52	3,74±0,41
298	4,03±0,75	3,72±0,35
303	4,02±0,51	3,65±0,40
308	4,18±0,16	3,59±0,38

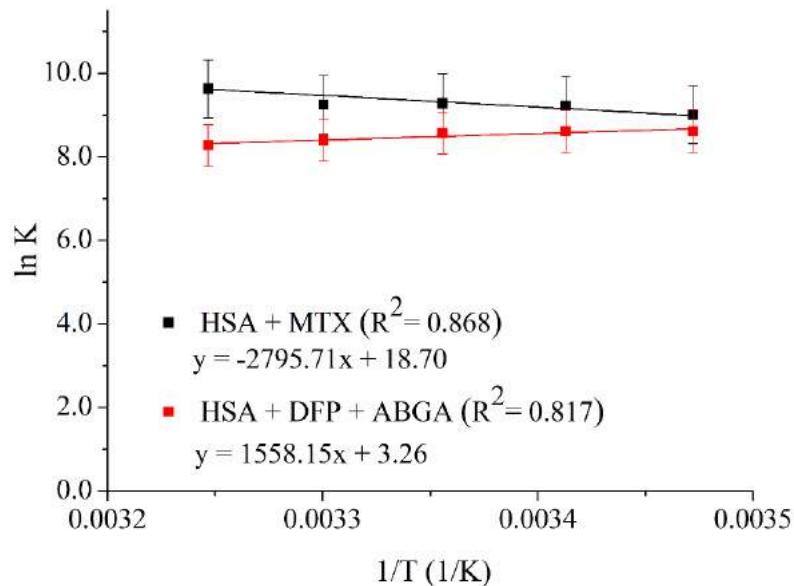
1. táblázat: A kötési állandók tízes alapú logaritmusának összehasonlítása a vizsgált kölcsönhatások esetében, különböző hőmérsékleteken.

A kötési állandók ismeretében a van 't Hoff egyenlet (**2. egyenlet**) alkalmazásával határoztuk meg a kölcsönhatásokhoz rendelhető szabadentalpiaváltozást (ΔG) szobahőmérsékleten, valamint a HSA hődenaturációjának hőmérsékletén (**2. táblázat**).

Hőmérséklet (K)	MTX-HSA ΔG (kJ/mol)	Fotodegradált MTX-HSA ΔG (kJ/mol)
288	-21,532	-30,512
353	-31,638	-34,474

2. táblázat: A vizsgált kölcsönhatásokat kísérő szabadentalpiaváltozások összehasonlítása.

A kölcsönhatásokra jellemző termodinamikai paraméterek kiszámítása céljából a kötési állandók természetes alapú logaritmusát ($\ln K$) a hőmérséklet reciprokának ($1/T$) függvényében ábrázolva megkaptuk az adott kölcsönhatásokra vonatkozó van 't Hoff függvényeket (**11. ábra**).



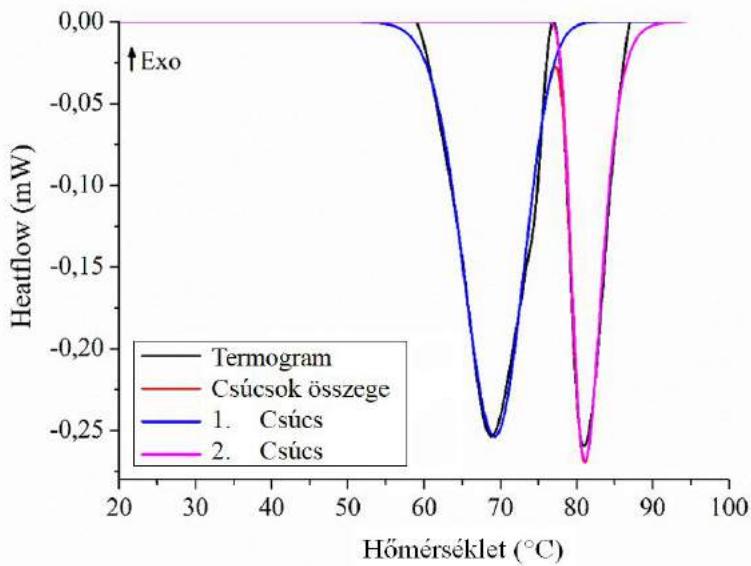
11. ábra: A HSA-MTX és HSA-fotodegradált MTX (DFP, ABGA) kölcsönhatások van 't Hoff függvényei.

A HSA-MTX kölcsönhatáshoz az adott hőmérséklettartományban mért nagyobb kötési állandók arra utalnak, hogy a HSA erősebben kapcsolódik a MTX-hoz, mint a MTX fotodegradációs termékeihez, ugyanakkor a kötés hőmérsékletfüggése ellentétes tendenciát mutat.

A kötési állandók felhasználásával kiszámítottuk, hogy a vizsgált hőmérséklettartományban a tanulmányozott kismolekulák (MTX, ill. fotodegradációs termékei) 99,99%-a HSA-hoz kötött formában van jelen a mintákban. Így a kalorimetriás mérések eredményeit nem befolyásolta az a körülmény, hogy magasabb hőmérsékleten a kismolekulák egy része disszociáció révén nem kapcsolódott a HSA-hoz.

5.1.3. A HSA hődenaturációjának kinetikájára gyakorolt hatás

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). minden termogramon 2 darab csúcs jelent meg (**12. ábra**).



12. ábra: A kaloriméter kiértékelő programja által felvett alapvonal és az elkülönített csúcsok a 450 µM HSA-t és 450 µM MTX-ot tartalmazó minta esetében, 1 K/min felfűtési sebesség alkalmazásával.

A 3. táblázatban tüntettük fel a különböző összetételű minták esetén, a különböző felfűtési sebességek alkalmazásával kapott termogramok 1. csúcsai esetében a legnagyobb jelhez tartozó hőmérséklet (T_{max}) értékeit.

Felfűtési sebesség (K/min)	450 µM HSA	450 µM HSA + 450 µM MTX	450 µM HSA + 450 µM DFP- ABGA
0,5	67,04±0,08	68,50±0,05	67,40±0,03
0,8	68,17±0,06	69,01±0,02	67,57±0,07
1	68,29±0,05	69,80±0,09	67,75±0,08
1,2	69,18±0,08	70,01±0,06	68,15±0,00

3. táblázat: A termogramok 1. csúcsainak T_{max} értékei.

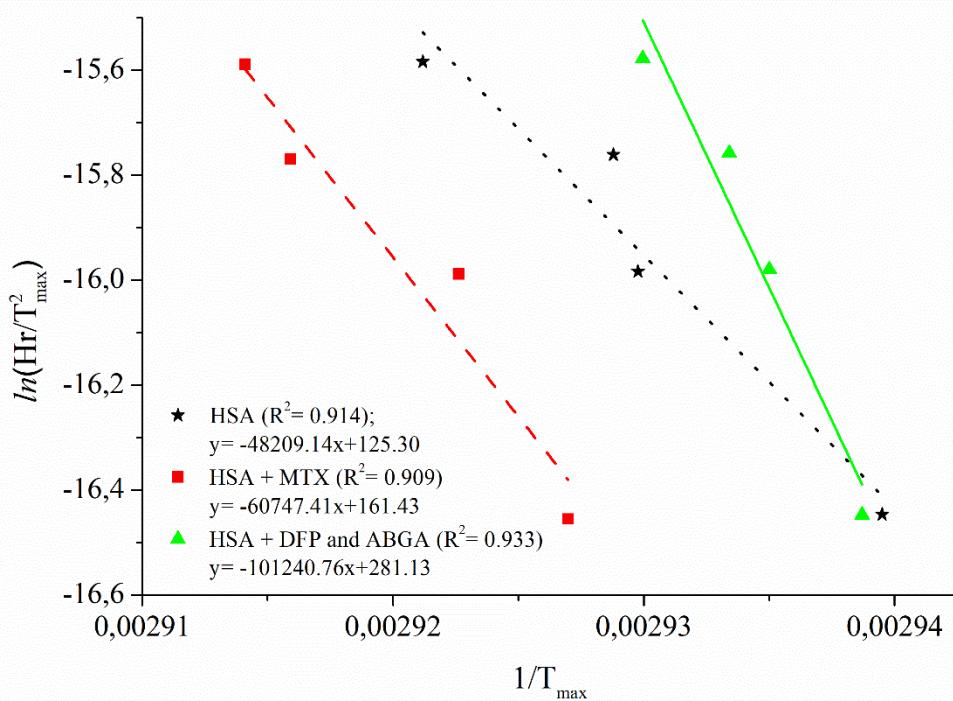
A 4. táblázat a termogramok 2. csúcsainak T_{max} értékeit mutatja be.

Felfűtési sebesség (K/min)	450 µM HSA	450 µM HSA + 450 µM MTX	450 µM HSA + 450 µM DFP- ABGA
0,5	80,24±0,06	79,75±0,04	80,14±0,03
0,8	80,96±0,05	79,81±0,06	80,24±0,01
1	82,54±0,05	79,84±0,04	80,36±0,07
1,2	85,22±0,01	80,12±0,01	80,55±0,03

4. táblázat: A termogramok 2. csúcsainak T_{max} értékei.

A reagensek nem változtatták szignifikánsan egyik csúcs T_{max} értékét sem.

A hődenaturáció aktiválási energiájának (E_a) meghatározása során minden esetben a termogramok 1. csúcsát vettük figyelembe. Az E_a kiszámításához először ábrázoltuk a Kissinger-függvényeket a **13. ábrán (3. egyenlet)**.



13. ábra: A HSA-t (pontozott vonal), HSA-t és MTX-ot (szaggatott vonal), illetve HSA-t és a MTX fotodegradációs termékeit (folytonos vonal) tartalmazó minták Kissinger-függvényei.

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 aktiválási energia (E_a)

meghatározásához. A kapott egyenesekből a **4. egyenlet** alkalmazásával egyszerűen kiszámíthatóak az E_a értékek, melyeket az **5. táblázat** szemléltet.

Aktiválási energia (E_a) (kJ/mol)	
450 μM HSA	400,81
450 μM HSA + 450 μM MTX	505,05
450 μM HSA + 450 μM DFP-ABGA	841,71

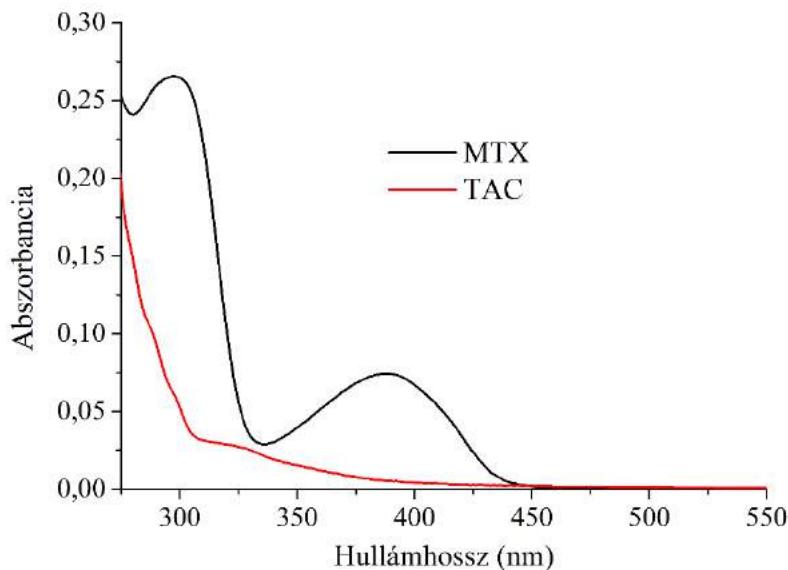
5. táblázat: A HSA hődenaturációjának E_a értékei a vizsgált mintákban.

A MTX és fotodegradációs termékei (DFP, ABGA) is növelték az E_a -t, de a fotodegradációs termékek nagyobb mértékben. Ebből azt a következtetést vontuk le, hogy az alkalmazott reagensek növelik a HSA stabilitását.

5.2. MTX és PHX kavitandszármazékokkal való kölcsönhatása

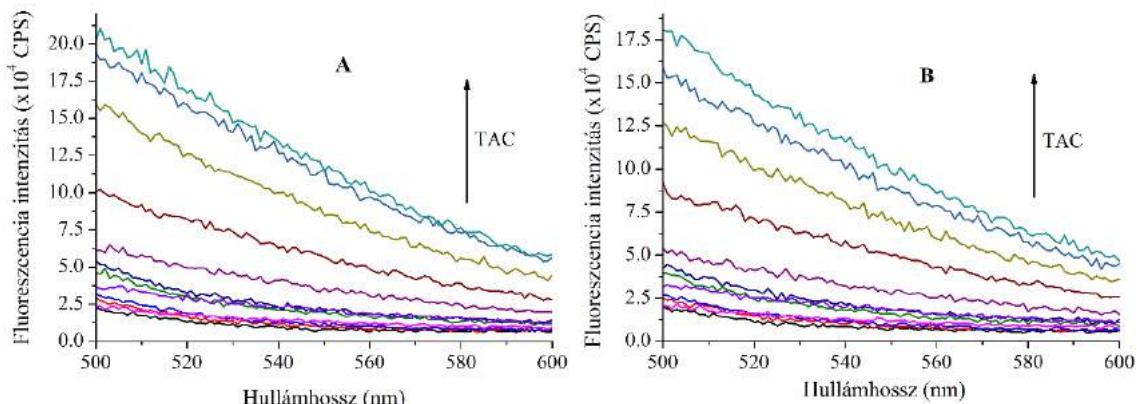
5.2.1. MTX-TAC kölcsönhatás vizsgálata

Tekintettel arra, hogy a MTX és a TAC egyaránt mutat fluoreszcenciát, ezért a fluoreszcenciás mérésekhez olyan gerjesztési hullámhosszat igyekeztünk választani, ahol csak az egyik kölcsönható komponens fluoreszkál. A MTX abszorpciós spektrumának 390 nm-en van egy csúcsa, míg ugyanezen a hullámhosszon a TAC kavitandszármazék nem mutat számottevő elnyelést (**14. ábra**). Ezért a MTX-TAC komplexek kötési állandónak meghatározásához szükséges fluorimetriás méréseket 390 nm-es gerjesztési hullámhossz alkalmazásával vettük fel.



14. ábra: MTX (10 µM) és TAC (10 µM) abszorpcióspektruma.

Az emissziós spektrumokat állandó MTX (10 µM) 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 (**15. ábra**). Az oldószer DMSO volt.



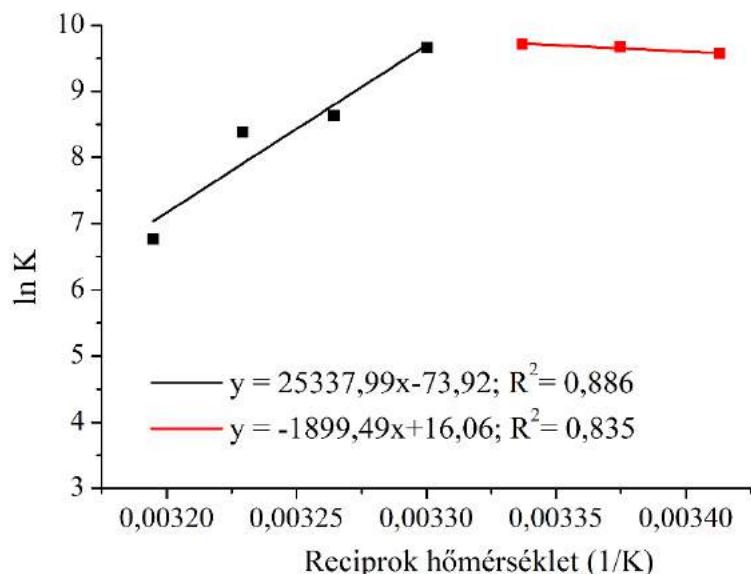
15. ábra: MTX-ot (10 µM) és TAC-ot (0-80 µM) tartalmazó minták emissziós spektruma 293,15 K (**A**) és 313,15 K (**B**) hőmérsékleteken (a nyilak a növekvő TAC-konzentrációt jelzik).

Az 540 nm-es emissziós hullámhosszhoz tartozó intenzitásértékeket használtuk a Benesi-Hildebrand egyenlettel (**1. egyenlet**) történő számításokhoz. Így megkaptuk a különböző hőmérsékletekre vonatkozó kötési állandókat, melyeknek tízes alapú logaritmusait a **6. táblázat** szemlélteti. Az adatok alapján a TAC stabil komplexeket képez MTX-tal.

Hőmérséklet (K)	log K
293,00	4,16±0,10
296,33	4,20±0,09
299,67	4,22±0,07
303,00	4,19±0,16
306,33	3,75±0,14
309,67	3,64±0,07
313,00	2,94±0,08

6. táblázat: A különböző hőmérsékletek esetén számolt kötési állandók tízes alapú logaritmusai.

A kötési állandók meghatározását követően ábrázoltuk a kölcsönhatás van 't Hoff függvényét (**16. ábra**).



16. ábra: A MTX-TAC komplexek képződésének van 't Hoff függvénye.

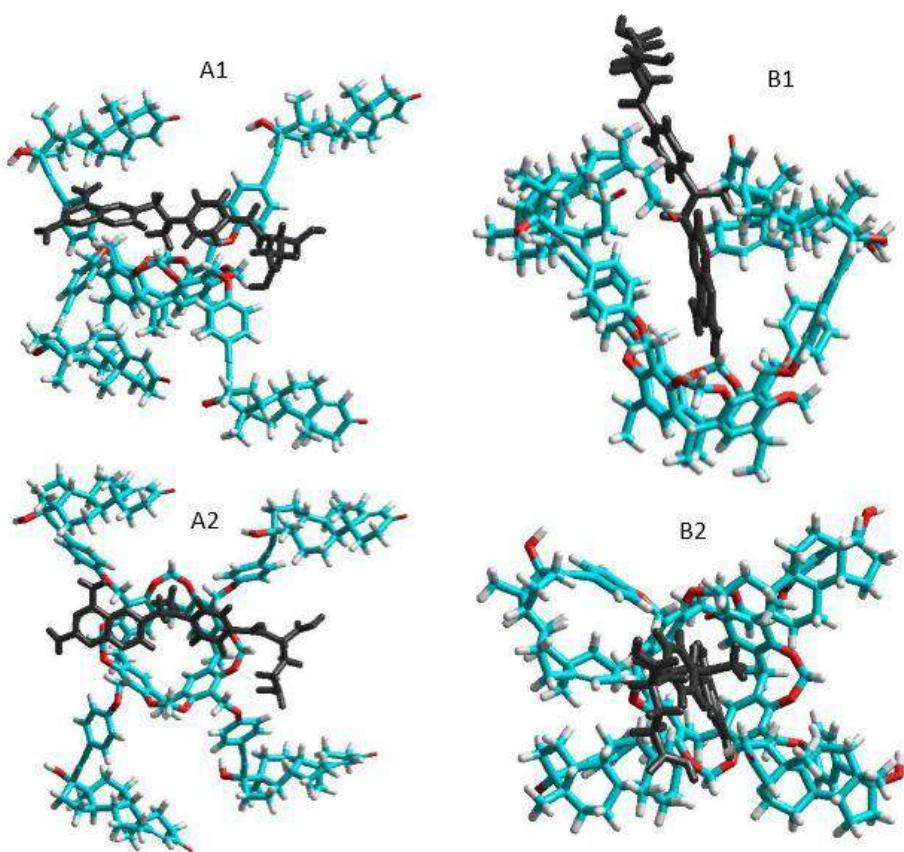
A van 't Hoff függvény nem egy, hanem két egyenesből áll, ami azt jelenti, hogy a komplexképződés mechanizmusa a hőmérséklettől függően eltérő lehet a vizsgált hőmérséklettartományon belül. A két hőmérséklettartományra számolt termodinamikai paramétereket a **7. táblázatban** tüntettük fel.

A HyperChem szoftver alkalmazásával számítógépes modellezéssel is vizsgáltuk a komplexképződést (**17. ábra**). A modellezés eredményei alapján a komplexeknek kétféle (nyitott, illetve zárt) formája jöhet létre. A szoftver segítségével szintén meghatároztuk a

komplexképződés termodinamikai paramétereit is, melyeket a **7. táblázatban** foglaltunk össze.

Kísérletes módszer			Modellezés		
Hőmérséklet (K)	ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔS (J K ⁻¹ mol ⁻¹)	szerkezet (lásd 17. ábra)	ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔS (J K ⁻¹ mol ⁻¹)
293,00-299,67	15,79±0,7	133,56±6	zárt	8,43	126,11
303,00-313,00	-210,66±1,7	-614,57±12	nyitott	-154,42	-214,67

7. táblázat: A MTX-TAC komplexek képződésének termodinamikai paraméterei.

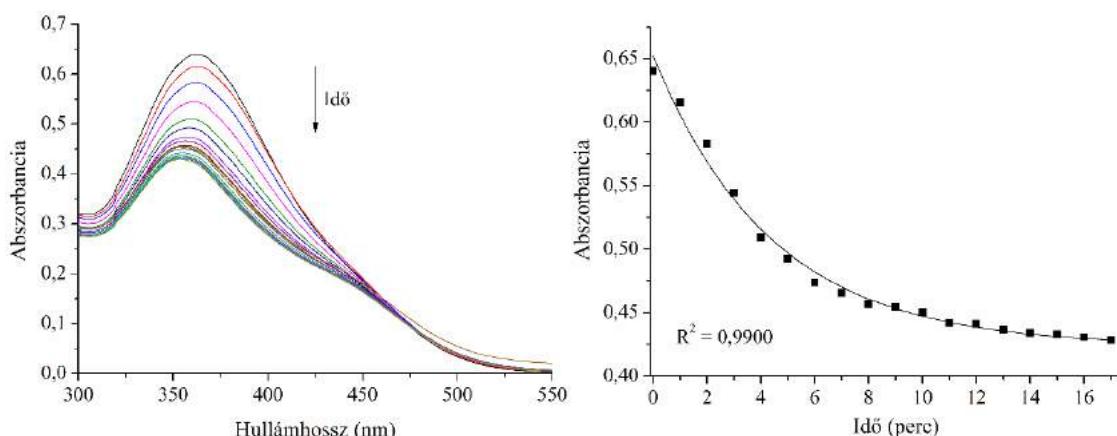


17. ábra: A MTX-TAC komplexek stabil konformációinak (nyitott: **A1**, **A2**; zárt: **B1**, **B2**) oldal- (**A1**, **B1**) és felülnézete (**A2**, **B2**). A kék, a fehér és a piros színek a TAC szén-, hidrogén- és oxigénatomjait jelölik, a fekete pedig a MTX molekulát.

A van 't Hoff módszerrel számolt és a számítógépes modellezés során kapott termodinamikai paraméterek jó egyezést mutatnak, ha figyelembe vesszük, hogy a modellezés elméleti számításai gázhalmazállapotot feltételeztek, vagyis az oldószer esetleges hatását nem vették figyelembe.

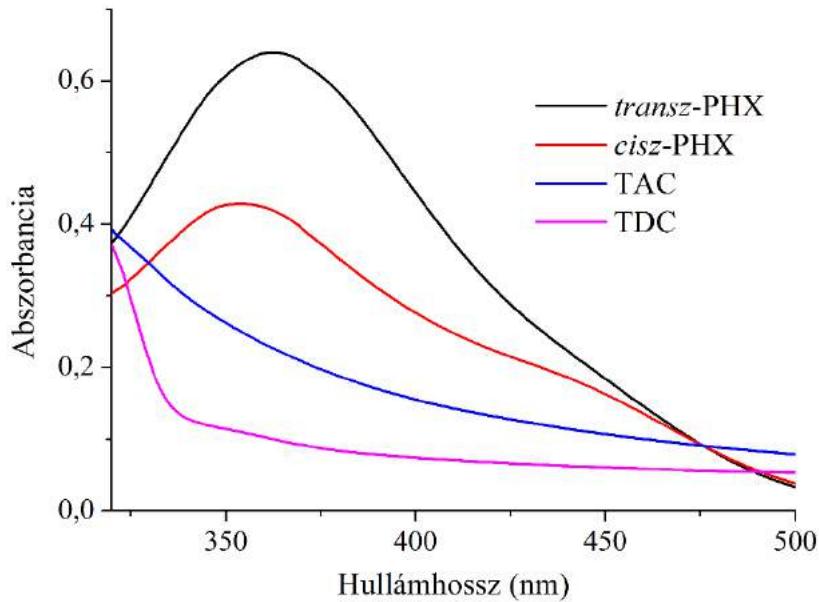
5.2.2. A PHX izomereinek TAC-dal és TDC-dal való kölcsönhatása

Ahhoz, hogy vizsgálni tudjuk a PHX minden két izomerét, először meg kellett győződniünk arról, hogy a stabilabb *transz* izomert át tudjuk alakítani az instabil (de farmakológiaileg hatásos) *cisz* izomerré. Ennek érdekében a mintát UV-lámpával 366 nm hullámhosszúságú fénnnyel világítottuk be. A bevilágítás közben percenként regisztráltuk az abszorpciós spektrumokat. Az izomerizáció folyamatának nyomon követése a **18. ábrán** látható.



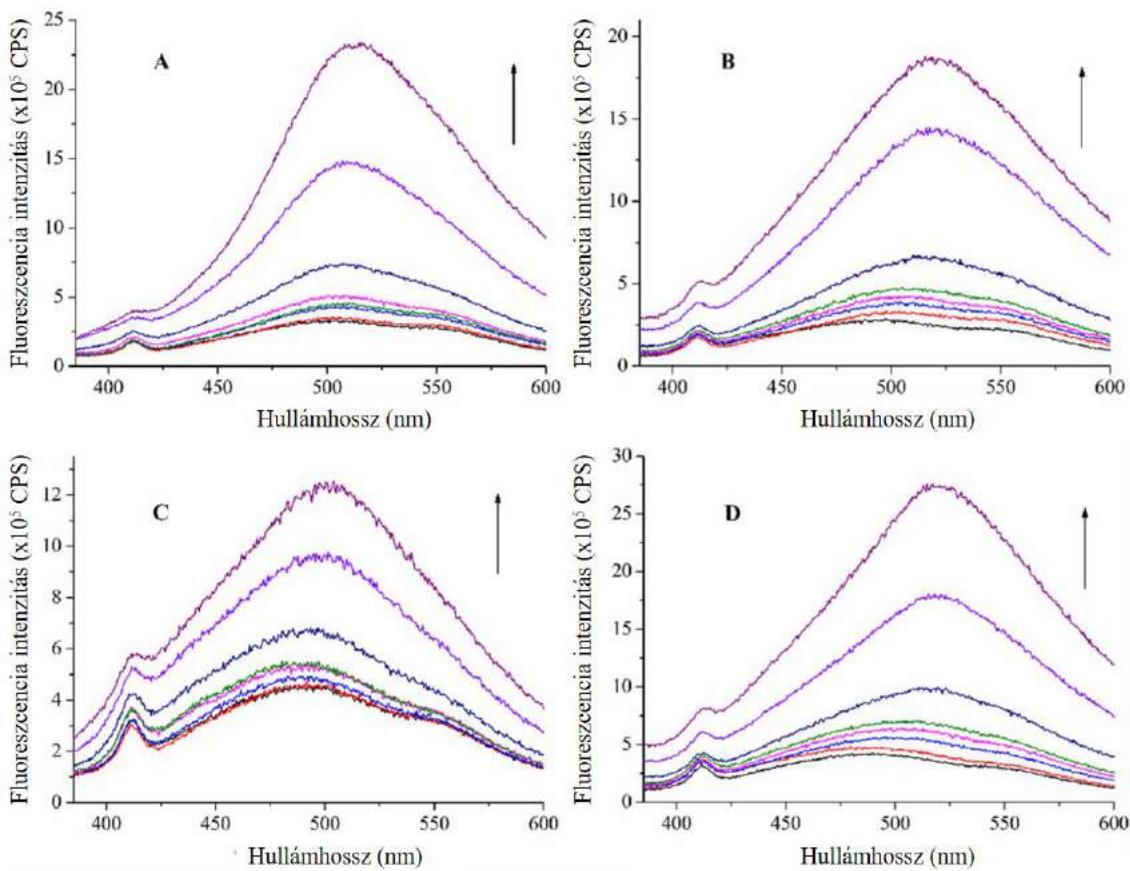
18. ábra: 50 μM *transz*-PHX oldat abszorpciós spektrumainak változása UV-bevilágítás hatására ($\lambda=366 \text{ nm}$) (A), illetve a 370 nm-es elnyelési csúcs változása a bevilágítási idő függvényében (B). Az oldószer PBS volt.

Ezután összehasonlítottuk a *transz*-PHX, a *cisz*-PHX, a TAC és a TDC abszorpciós spektrumait (**19. ábra**). A PHX izomereinek 370 nm körül van abszorpciós csúcsa (a *transz* \rightarrow *cisz* átalakulás során kismértékű hipszokróm eltolódás figyelhető meg). A kavitandszármazékok ugyanezen hullámhossz környékén sokkal kisebb mértékben nyelnek el, ezért a fluorimetriás vizsgálatok során 366 nm-es gerjesztési hullámhosszt alkalmaztunk.



19. ábra: *Transz*-PHX, *cisz*-PHX, TAC és TDC abszorpciós spektrumai. Az összes vizsgált minta koncentrációja 50 μM volt.

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. Eredményeink a **20. ábrán** láthatók.



20. ábra: *Transz*-PHX (A, B) és *cisz*-PHX (C, D) emissziós spektrumai TAC (A, C) és TDC (B, D) hiányában és változó koncentrációja mellett (0-450 μ M) ($\lambda_{exc}=366$ nm). A nyilak a kavitandszármazékok koncentrációjának növekedését jelzik.

A különböző komplexek kötési állandóinak meghatározásához a Benesi-Hildebrand egyenletet alkalmaztuk (**1. egyenlet**), melyhez a 490 nm-es emissziós csúcs intenzitásértékeit használtuk fel (**8. táblázat**).

Hőmérséklet (K)	log K			
	<i>transz</i> -PHX- TAC	<i>transz</i> -PHX- TDC	<i>cisz</i> -PHX- TAC	<i>cisz</i> -PHX- TDC
293	3,55±0,19	3,05±0,15	2,07±0,17	3,08±0,25
298	3,62±0,21	2,95±0,19	2,40±0,21	3,03±0,21
303	3,89±0,18	2,88±0,17	2,78±0,22	2,90±0,22
308	4,01±0,20	2,73±0,16	3,01±0,20	2,88±0,18

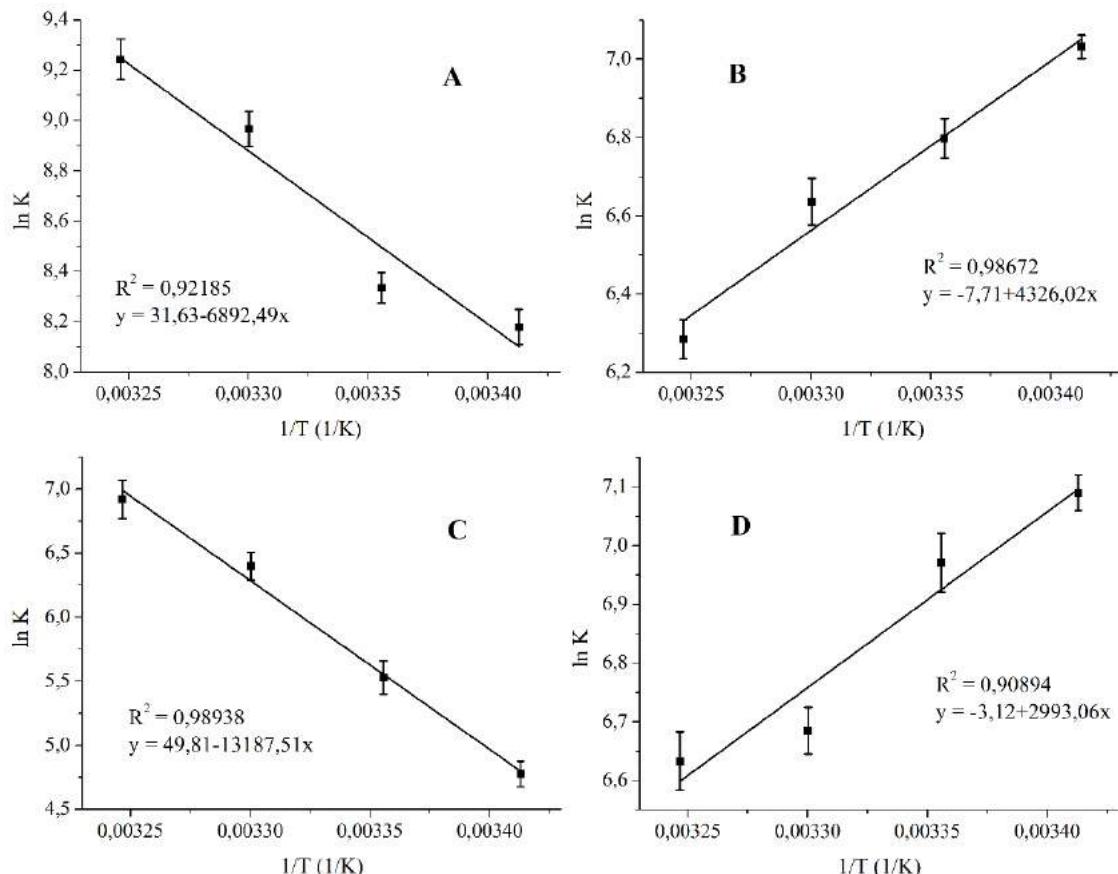
8. táblázat: A vizsgált komplexek kötési állandóinak tízes alapú logaritmusai a különböző hőmérsékleteken.

A kötési állandók ismeretében a van 't Hoff egyenletet (**2. egyenlet**) alkalmazva meghatároztuk a komplexek képződésének termodinamikai paramétereit (**9. táblázat**).

	$\Delta H \text{ (kJ} \cdot \text{mol}^{-1}\text{)}$	$\Delta S \text{ (J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}\text{)}$	$\Delta G \text{ (kJ} \cdot \text{mol}^{-1}\text{)}$
<i>transz</i> -PHX-TAC	$57,30 \pm 2,84$	$262,97 \pm 11,36$	$-21,10 \pm 4,03$
<i>transz</i> -PHX-TDC	$-35,97 \pm 3,69$	$-64,10 \pm 10,43$	$-16,85 \pm 3,21$
<i>cisz</i> -PHX-TAC	$109,65 \pm 6,93$	$414,12 \pm 17,51$	$-13,83 \pm 3,35$
<i>cisz</i> -PHX-TDC	$-24,88 \pm 3,20$	$-25,94 \pm 4,72$	$-17,15 \pm 3,62$

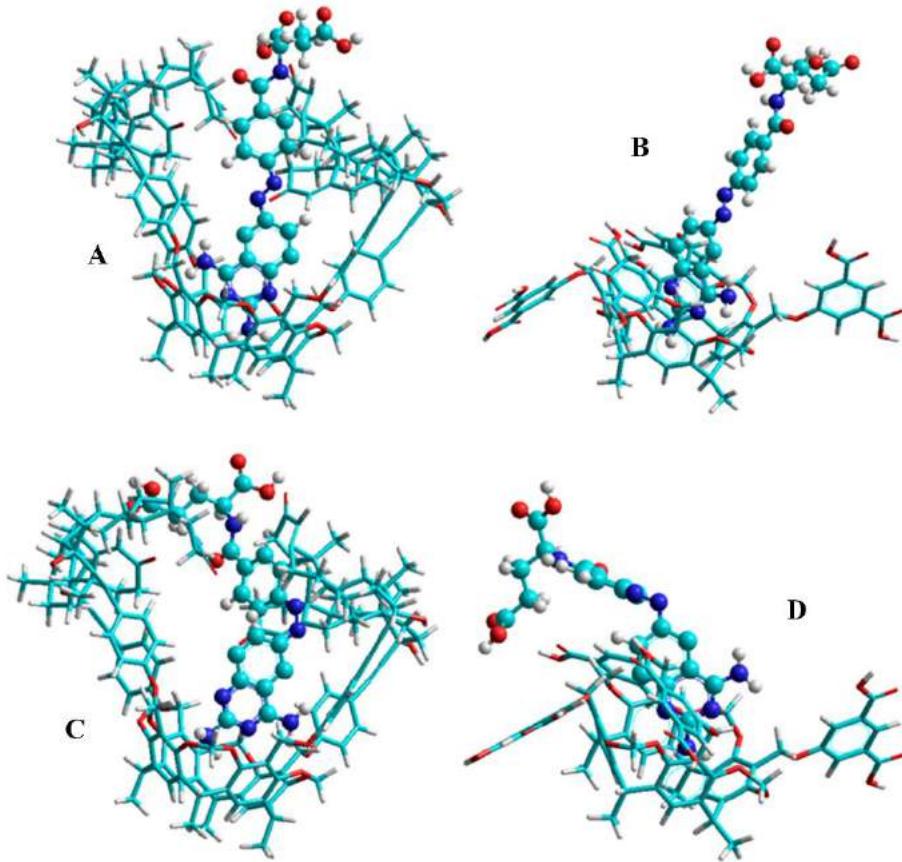
9. táblázat: A vizsgált komplexek számolt termodinamikai paraméterei. A ΔG értékeket 298 K hőmérsékletre vonatkoztatva határoztuk meg.

Ábrázoltuk a kölcsönhatások van 't Hoff függvényeit is (**21. ábra**), melyek alapján azt a következtetést vontuk le, hogy a kétféle kavitandszármazék eltérő mechanizmussal komplexálja a PHX izomereit.



21. ábra: A *transz*-PHX-TAC (**A**), *transz*-PHX-TDC (**B**), *cisz*-PHX-TAC (**C**) és *cisz*-PHX-TDC (**D**) kölcsönhatások van 't Hoff függvényei.

Ezen komplexek kialakulását is vizsgáltuk számítógépes modellezéssel, a HyperChem szoftver segítségével. Eredményeinket a **22. ábra** szemlélteti.



22. ábra: A *transz*-PHX-TAC (**A**), *transz*-PHX-TDC (**B**), *cisz*-PHX-TAC (**C**) és *cisz*-PHX-TDC (**D**) háromdimenziós modelljei (a világoskék, sötétkék, piros, és fehér színek rendre a szén-, nitrogén-, oxigén- és hidrogénatomokat jelölik). A PHX molekulák atomjait gömbökkel, a kavitandok molekuláinak atomjait pálcákkal jelöltük a könnyebb áttekinthetőség céljából.

Az elméleti modellezés segítségével szintén meghatároztuk a komplexek képződésének termodinamikai paramétereit, melyeket a **10. táblázatban** tüntettünk fel.

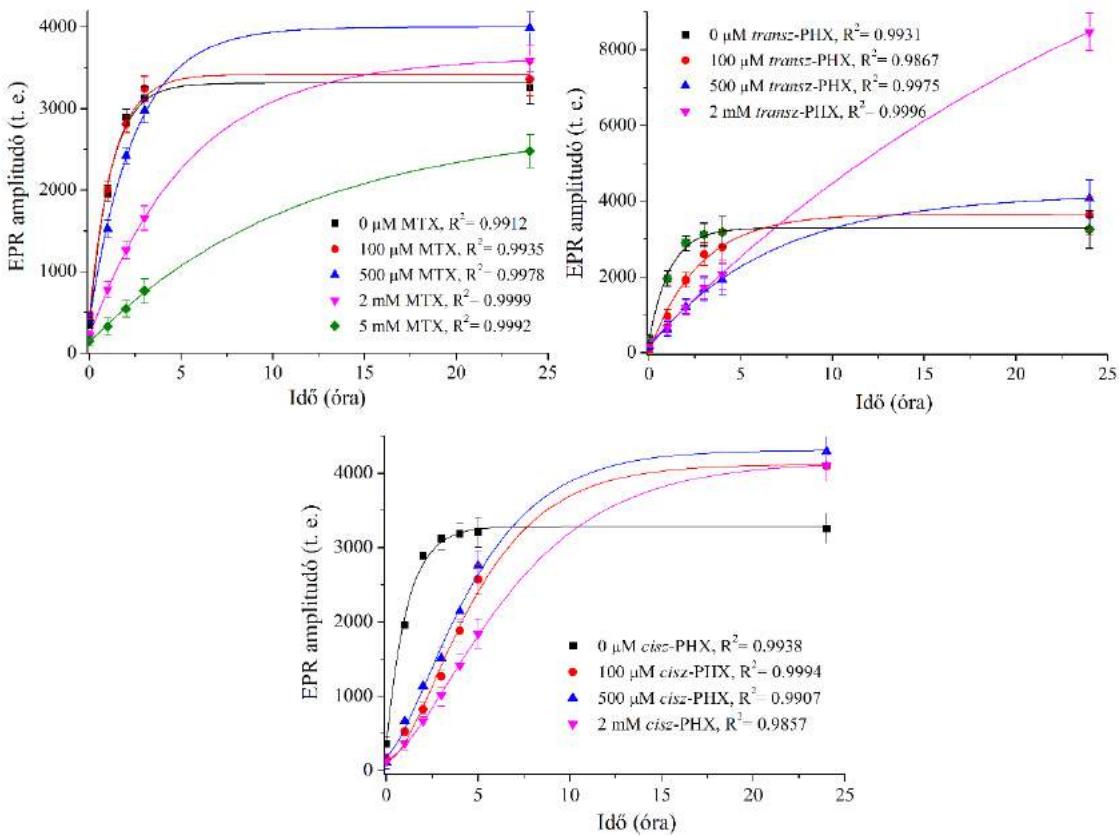
	ΔH (kJ·mol ⁻¹)	ΔS (J·K ⁻¹ ·mol ⁻¹)	ΔG (kJ·mol ⁻¹)
<i>transz</i> -PHX-TAC	42,013	210,99	-20,89
<i>transz</i> -PHX-TDC	-33,63	-58,13	-16,29
<i>cisz</i> -PHX-TAC	101,11	392,09	-15,79
<i>cisz</i> -PHX-TDC	-23,54	-22,93	-16,70

10. táblázat: A számítógépes modellezéssel számolt termodinamikai paraméterek. A ΔG értékeket 298 K hőmérsékletre vonatkoztatva határoztuk meg.

A számított adatok alátámasztották azt a fluorimetriás mérések alapján alkotott feltételezésünket, hogy a különböző kavitandok eltérő mechanizmussal komplexálják a PHX izomereit.

5.3. 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. A kapott EPR jelek amplitudóinak átlagait a **23. ábra** szemlélteti.



23. ábra: A kapott EPR jelek amplitudóinak átlaga a MTX-ot (0-5000 µM, A), transz-PHX-ot (0-2000 µM, B) és cisz-PHX-ot (0-2000 µM, C) tartalmazó minták esetében, az idő függvényében ábrázolva.

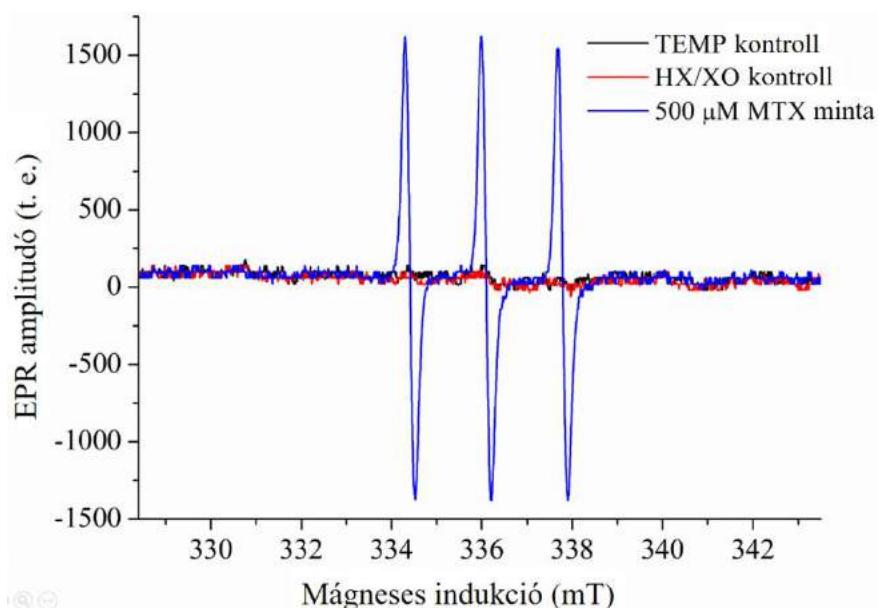
A mérési pontokra illesztett görbék segítségével, grafikus módszerrel meghatároztuk a reakciósebességi együtthatókat (k), melyek így az egyes mintákban a szuperoxid gyökök termelődésének sebességéről adnak információt (11. táblázat). Az oldószerben (HEPES-Krebs puffer, pH 7,4) a PHX izomerei 5000 µM koncentrációban már nem oldódtak, ezért ebben a koncentrációban csak a MTX-ot mértük.

Koncentráció (μM)	$\ln k$		
	MTX	<i>transz</i> -PHX	<i>cisz</i> -PHX
0	$-8,70 \pm 0,16$	$-8,69 \pm 0,18$	$-8,68 \pm 0,15$
100	$-8,79 \pm 0,23$	$-9,56 \pm 0,15$	$-9,16 \pm 0,25$
500	$-9,46 \pm 0,21$	$-10,46 \pm 0,28$	$-9,19 \pm 0,26$
2000	$-10,25 \pm 0,25$	$-11,96 \pm 0,23$	$-9,51 \pm 0,29$
5000	$-11,01 \pm 0,20$	-	-

11. táblázat: A vizsgált mintákban a szuperoxid gyök-termelődés sebességi együtthatóinak természetes alapú logaritmusai.

Eredményeink alapján a három vizsgált vegyület közül a *transz*-PHX csökkenti a legnagyobb mértékben a gyöktermelődés sebességét. A legalacsonyabb, 100 μM koncentráció esetében a *cisz*-PHX hatására nagyobb mértékben csökkent a sebesség, 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 mértünk (**24. ábra**).



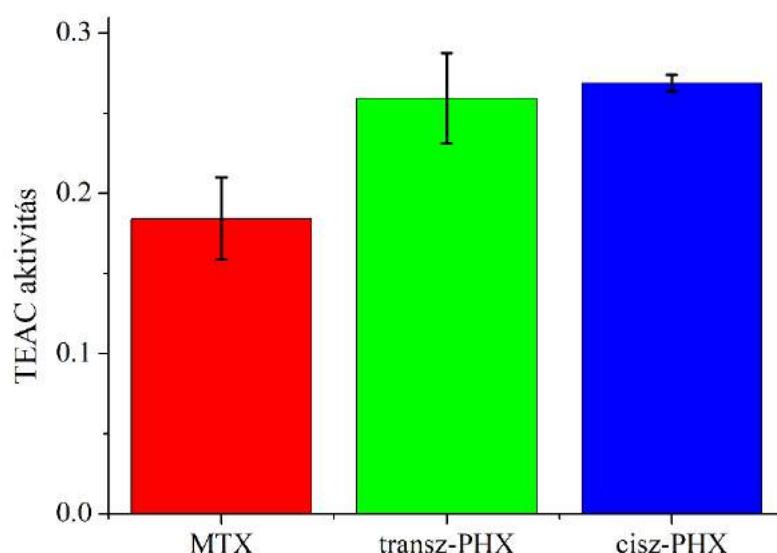
24. ábra: A kontrollok és az 500 μM MTX-ot tartalmazó minta EPR spektrumai.

Minden spektrumot 3 órával a mintaelőkészítést követően regisztráltunk.

A kontrollok nem adtak kiértékelhető EPR jelet.

5.4. 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 MTX-ot, *transz*-PHX-ot és *cisz*-PHX-ot tartalmazó minták abszorpcióját mértük 734 nm-en. A mérések alapján számolt TEAC-értékeket a **25. ábra** szemlélteti.



25. ábra: A MTX, *transz*-PHX és *cisz*-PHX TEAC-értékei, ABTS esszével meghatározva.

A PHX izomereinek TEAC-értékei között nem volt szignifikáns különbség, azonban a MTX TEAC-értéke szignifikánsan alacsonyabb volt a PHX minden izomerének értékeinél, tehát a PHX nagyobb mértékű antioxidáns hatást mutatott.

6. Megbeszélés, következtetések

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

Mivel a MTX egy évtizedek óta elterjedt, elsővonalbeli reuma- és daganatellenes gyógyszerhatóanyag, a HSA pedig talán a legfontosabb fehérje a humán vérplazmában, így természetesen gazdag irodalma van a MTX és HSA kölcsönhatásával kapcsolatos kutatásoknak (Panja és mtsai., 2018; Cheng és mtsai., 2017; Coassolo és mtsai., 1980). Azonban a HSA-nak a MTX fotodegradációs termékeivel, a 2,4-diamino-6-formilpterinnel (DFP) és a *p*-amino-benzoilglutaminsavval (ABGA) való kölcsönhatásának vizsgálatáról nem találtunk szakirodalmi forrást.

A fluorimetriás mérések alapján (a Benesi-Hildebrand egyenlettel) 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.

Elsőként vizsgáltuk a MTX-nak és fotodegradációs termékeinek a HSA hődenaturációjára gyakorolt hatását. A fehérjék stabilitása (denaturációja és renaturációja) több betegségben is kulcsszerepet játszik (pl. Parkinson-, Alzheimer-, Huntington-kór), ezért intenzíven kutatott terület (Istikhar és mtsai, 2016).

A kalorimetriás mérések során kapott termogramokon minden esetben (a minták összetételétől és a felfűtési sebességtől függetlenül) két csúcs volt látható. A HSA II-es és III-as doménjeinek stabilitása nagyon hasonló, ezek a domének felelnek a fehérje legfőbb feladatainak ellátásáért (pl. szubsztrátok kötéséért). Az I-es domén azonban elsősorban a fehérje stabilitásáért felelős, ezért lényegesen stabilabb, mint a másik két domén (Kamal és mtsai., 2004). Így valószínűleg a termogramok 1. csúcsa a II-es és III-as domének denaturációja során adott jel, a 2. csúcs pedig az I-es domén denaturációját jelzi. Szakirodalmi adatok alapján a MTX kötőhelye a IIA aldoménen van (Panja és

mtsai., 2018), ezért az adatok kiértékelése során a termogramok 1. csúcsát vettük figyelembe.

A felfűtési sebesség növelésének hatására minden minta esetében nőtt a HSA denaturációját jelző csúcsokhoz tartozó hőmérséklet, de a MTX vagy a MTX fotodegradációs termékeinek hatása nem volt ilyen egyértelmű. Az 1. csúcshoz tartozó T_{max} értékek MTX jelenlétében nőttek, DFP és ABGA jelenlétében csökkentek a csak HSA-t tartalmazó mintákhoz képest. A Kissinger-függvények ábrázolásakor az egyenesek jól illeszkedtek az adatpontokra ($R^2 > 0,900$), így arra következtünk, hogy (mivel a HSA denaturációja elsőrendű kinetika szerint játszódik le) a Kissinger-módszer megfelelő az aktiválási energia (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 gyulladásos mediátorként viselkednek, így a fehérjestabilizáló hatású vegyületek sokszor gyulladáscsökkentő hatással is bírnak (Khan és mtsai., 2015), például a nemszteroid gyulladáscsökkentő hatóanyagokkal kapcsolatban is leírták a fehérjestabilizáló hatást (Saso és mtsai., 2001). A MTX is gyulladáscsökkentő (reumaellenes) hatóanyag, így azt feltételezzük, hogy hatásának kifejtésében a számos, eddig felderített mechanizmus mellett a fehérjestabilizálás is szerepet játszhat.

6.2. MTX és PHX kölcsönhatásai kavitand származékokkal

A szakirodalomban számos olyan forrást találhatunk, melyben leírták a MTX kölcsönhatását különböző makrociklusos befogadó molekulával, például ciklodextrinekkel (Bourkaib és mtsai., 2013; Pattarino és mtsai., 2005; Aykaç és mtsai., 2012), kukurbiturilokkal (Chang és mtsai., 2017) és kalixarénekkel (Shalaeva és mtsai., 2018). Azonban nem találtunk utalást arra, hogy MTX és rezorcinarén kavitand kölcsönhatását illetően történtek volna vizsgálatok, annak ellenére, hogy a kavitandok (a kalixarénekhez hasonlóan) előnyösebbek a MTX-tal való kölcsönhatás szempontjából a ciklodextrineknél és kukurbituriloknál. Ennek oka a kavitandok és kalixarének üregében levő aromás molekularész, mely a MTX molekulájával π - π és CH- π kölcsönhatásba is képes lépni (Shalaeva és mtsai., 2018). Ezért vizsgáltuk meg a MTX kölcsönhatását egy kavitandszármazékkal, a TAC-dal.

A minták emissziós intenzitása az emelkedő TAC-koncentráció hatására növekedést mutatott. Ennek a hátterében kétféle jelenség is állhat: egyrészt a MTX a komplexképződés miatt részben elveszti szolvátburkát, így az oldószermolekulák kioltó hatása kevésbé érvényesül; másrészt a befogadó molekula üregében a MTX elveszti rugalmasságát, szerkezete merevebb lesz.

A kötési állandók alapján arra következtethetünk, hogy a MTX stabil komplexeket képez a TAC-dal. A komplexképződés termodinamikájának vizsgálata során (a van 't Hoff függvény ábrázolásakor) arra a következtetésre jutottunk, hogy a vizsgált hőmérséklettartományon belül a komplexek konformációja a hőmérséklettől függően eltérő lehet. Az alacsonyabb hőmérsékleteken az entrópianövekedés entalpianövekedéssel 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 etiszteron-csoporttal rendelkező karjaival lép kölcsönhatásba. Ezzel szemben a magasabb hőmérsékletű régióban (303,00-313,00 K) a TAC nyitott konformációban van, az etiszteron 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 entrópianövekedés 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 entalpiacsökkenést 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.

A PHX minden izomere stabil komplexeket alkot minden kavitaanddal, azonban a kölcsönhatások termodinamikai paramétere miatt arra következtethetünk, hogy a különböző kavitandok a vizsgált hőmérséklettartományon belül eltérő mechanizmussal komplexálják a PHX molekulát. Ennek hátterében a kavitandok szerkezete közti különbség áll.

A TAC esetében energiabefektetés (entalpianövekedés) szükséges az etiszteron karok „kinyitásához”, a vendég molekula csak így tud az aromás szerkezetű üreggel kölcsönhatásba lépni. Az entrópianövekedést 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 entrópianövekedéssel jár. A komplexképződés eredményeképpen merevebbé váló befogadó és vendég molekulák már nettó entrópiacsökkenést okoznak.

6.3. MTX és PHX antioxidáns tulajdonságainak összehasonlítása

Mivel a kardiovaszkuláris betegségeket (CVD-ket) is szisztemás gyulladásoknak tekinthetjük (ugyanúgy, mint pl. a RA-t), a betegségmódosító antireumatikus gyógyszerek kardiovaszkuláris kockázatra gyakorolt hatása az elmúlt évtizedben intenzíven kutatott területté vált (Bartoloni és mtsai., 2018; Thanigaimani és mtsai., 2021; Lems és mtsai., 2021). A kolhicin az első olyan gyulladáscsökkentő hatóanyag, mely miokardiális infarktus szekunder prevenciójában hatásosnak bizonyult egy randomizált, kettősvak klinikai vizsgálatban (Tardif és mtsai., 2019).

XO esszé alkalmazásával, EPR spektroszkópiás módszerrel hasonlítottuk össze a MTX, a *transz*-PHX és a *cisz*-PHX szuperoxid gyökfogó tulajdonságait (Zimmermann és mtsai., 2017). A PHX-nak – mivel viszonylag új molekula – még nem vizsgálták hasonló tulajdonságait.

Az EPR jelek amplitudóinak időben való változása alapján kiszámoltuk a XO/HX rendszer által termelt szuperioxid gyökök termelődésének sebességi együtthatóját (k), illetve ezen állandó természetes alapú logaritmusát ($\ln k$). 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. Ezért a **23. ábrán** a görbék maximumainak értéke kevésbé fontos adat.

Eredményeink alapján minden vizsgált anyagra jellemző, hogy minél nagyobb koncentrációban voltak jelen a mintákban, annál nagyobb mértékben csökkentették a gyöktermelés sebességét. Fontos megjegyezni, hogy ez a csökkenés nem a XO gátlásának az eredménye, a vizsgált anyagok nem befolyásolják a HX oxidációját (Zimmermann és mtsai., 2017).

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 kifejezettedebb volt.

Az ABTS esszé esetében a három vizsgált vegyület ABTS^{•+}-fogó tulajdonságát hasonlítottuk össze a TEAC-értékek segítségével, és részben eltérő eredményt kaptunk a XO esszéhez képest. 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.

Mindezek alapján feltételezhető, hogy a *transz*-PHX kifejezettedebb gyökfogó, antioxidáns hatással bír, mint a MTX. Ez különösen azért meglepő eredmény, mert a *transz*-PHX a citotoxikus hatás szempontjából inaktív izomer, antioxidáns hatás szempontjából azonban hatásosabbnak bizonyult a MTX-nál.

7. Összefoglalás

Munkánk során a HSA kölcsönhatását vizsgáltuk MTX-tal és annak fotodegradációs termékeivel, valamint kimutattuk, hogy minden kölcsönhatás a fehérje stabilitásának növekedését okozza. Ez szerepet játszhat a MTX reumaellenes hatásának kialakításában, azonban további kutatások szükségesek ennek a felfedezésnek az alátámasztásához.

Tanulmányoztuk a MTX és PHX kavitandokkal kialakított komplexit, és megállapítottuk, hogy ezen komplexeknek (a hőmérséklettől, illetve a kavitandok funkcionális csoportjaitól függően) különböző konformációik létezhetnek, melyek különböző termodinamikai paraméterekkel jellemzhetők. 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 indokolttá 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 képezzhetik a jövőbeli *in vivo* vizsgálatok alapját, illetve lehetővé teszik azok indokoltságának megállapítását is.

8. 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 minden 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.

9. Irodalomjegyzék

Allegra CJ, Chabner BA, Drake JC, Lutz R, Rodbard D, Jolivet J. Enhanced inhibition of thymidylate synthase by methotrexate polyglutamates. *J. Biol. Chem.* **1985**, 260, 9726-9726.

Anderson DR, Duryee MJ, Shurmur SW, Um JY, Bussey WD, Hunter CD, Garvin RP, Sayles HR, Mikuls TR, Klassen LW, Thiele GM. Unique Antibody Responses to Malondialdehyde-Acetaldehyde (MAA)-Protein Adducts Predict Coronary Artery Disease. *PLOS One* **2014**, 9, e107440.

Assaraf YG. Molecular basis of antifolate resistance. *Cancer Metastasis Rev.* **2007**, 26, 153-181.

Aykaç A, Martos-Maldonado MC, Casas-Solvas JM, García-Fuentes L, Vargas-Berenguel A. Binding ability properties of β -cyclodextrin dimers linked through their secondary faces towards cancer chemotherapeutic agent methotrexate. *J. Drug Del. Sci. Tech.* **2012**, 22, 270–272.

Babii O, Afonin S, Garmanchuk LV, Nikulina VV, Nikolaienko TV, Storozhuk OV, Shelest DV, Dasyukevich OI, Ostapchenko LI, Iurchenko V, Zozulya S, Ulrich AS, Komarov IV. Direct Photocontrol of Peptidomimetics: An Alternative to Oxygen-Dependent Photodynamic Cancer Therapy. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2016**, 55, 5493-5496.

Bačić G, Pavićević A, Peyrot F. In vivo evaluation of different alterations of redox status by studying pharmacokinetics of nitroxides using magnetic resonance techniques. *Redox Biol.* **2016**, 8, 226–242.

Balis FM, Mirro Jr J, Reaman GH, Evans WE, McCully C, Doherty KM, Murphy RF, Jeffries S, Poplack DG. Pharmacokinetics of subcutaneous methotrexate. *J. Clin. Oncol.* **1988**, 6, 1882-1886.

Banghart MR, Mourot A, Fortin DL, Yao JZ, Kramer RH, Trauner D. Photochromic blockers of voltage-gated potassium channels. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, 48, 9097-9101.

Bartoloni E, Alunno A, Valentini V, Luccioli F, Valentini E, La Paglia GM, Leone MC, Cafaro G, Marcucci E, Gerli R. Targeting Inflammation to Prevent Cardiovascular Disease in Chronic Rheumatic Diseases: Myth or Reality? *Front. Cardiovasc. Med.* **2018**, 5, 177.

Borowiak M, Nahaboo W, Reynders M, Nekolla K, Jalino P, Hasserodt J, Rehberg M, Delattre M, Zahler S, Vollmar A, Trauner D, Thorn-Seshold O. Photoswitchable Inhibitors of Microtubule Dynamics Optically Control Mitosis and Cell Death. *Cell* **2015**, 162, 403-411.

Bostrom BC, Erdmann GR, Kamen BA. Systemic methotrexate exposure is greater after intrathecal than after oral administration. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **2003**, 25, 114-117.

Bourkaib N, Zhou J, Yao J, Fang Z, Mezghrani O. Combination of β -cyclodextrin inclusion complex and self-microemulsifying drug delivery system for photostability and enhanced oral bioavailability of methotrexate: novel technique. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2013**, 39, 918–927.

Broichhagen J, Frank JA, Trauner D. A roadmap to success in photopharmacology. *Acc. Chem. Res.* **2015**, 48, 1947-1960.

Chabner BA, Roberts Jr TG. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, 5, 65-72.

Chang Y-X, Zhang X-M, Duan X-C, Liu F, Du L-M. Supramolecular interaction of methotrexate with cucurbit[7]uril and analytical application. *Spectrochim. Acta* **2017**, 183, 131–137.

Cheng LY, Fang M, Bai AM, Ouyang Y, Hu YJ. Insights into the interaction of methotrexate and human serum albumin: a spectroscopic and molecular modeling approach. *Luminescence* **2017**, 32, 873-879.

Choi HK, Hernán MA, Seeger JD, Robins JM, Wolfe F. Methotrexate and mortality in patients with rheumatoid arthritis: a prospective study. *Lancet* **2002**, 359, 1173-1177.

Chuang YP, Xue J, Du Y, Li M, An H, Phillips DL. Time-resolved resonance Raman and density functional theory investigation of the photochemistry of (S)-ketoprofen. *J. Phys. Chem. B* **2009**, 113, 10530-10539.

Clavant SP, Comper WD. Urinary clearance of albumin is critically determined by its tertiary structure. *J. Lab. Clin. Med.* **2003**, 142, 372-384.

Coassolo P, Valentin M, Bourdeaux M, Briand C. Modification of human serum albumin binding of methotrexate by folinic acid and certain drugs used in cancer chemotherapy. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1980**, 17, 123-127.

Cram DJ. Cavitands: organic hosts with enforced cavities. *Science* **1983**, 219, 1177-1183.

Cronstein BN, Aune TM. Methotrexate and its mechanisms of action in inflammatory arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2020**, 16, 145-154.

Cronstein BN, Naime D, Ostad E. The antiinflammatory mechanism of methotrexate. Increased adenosine release at inflamed sites diminishes leukocyte accumulation in an in vivo model of inflammation. *J. Clin. Invest.* **1993**, 92, 2675-2682.

Cronstein BN, Sitkovsky M. Adenosine and adenosine receptors in the pathogenesis and treatment of rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2017**, 13, 41-51.

Csók Zs, Kégl T, Párkányi L, Varga Á, Kunsági-Máté S, Kollár L. Facile, high-yielding synthesis of deepened cavitands: a synthetic and theoretical study. *Supramol. Chem.* **2011**, 23, 710–719.

de Lathouder S, Gerards AH, de Groot ER, Valkhof M, Aarden LA. Mycophenolic acid and methotrexate inhibit lymphocyte cytokine production via different mechanisms. *Eur. Cytokine Netw.* **2002**, 13, 317-323.

de Lathouder S, Gerards AH, Dijkmans BAC, Aarden LA. Two inhibitors of DNA-synthesis lead to inhibition of cytokine production via a different mechanism. *Nucleos. Nucleot. Nucl.* **2004**, 23, 1089-1100.

Dikalov S, Griendl KK, Harrison DG. Measurement of Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Studies. *Hypertension* **2007**, 49, 717–727.

Dikalov SI, Polienko YF, Kirilyuk I. Electron Paramagnetic Resonance Measurements of Reactive Oxygen Species by Cyclic Hydroxylamine Spin Probes. *Antioxid. Redox Signal.* **2018**, 28.

Fahmy SA, Brüßler J, Alawak M, El-Sayed MMH, Bakowsky U, Shoeib T. Chemotherapy Based on Supramolecular Chemistry: A Promising Strategy in Cancer Therapy. *Pharmaceutics* **2019**, 11, 292.

Fairbanks LD, Rückemann K, Qiu Y, Hawrylowicz CM, Richards DF, Swaminathan R, Kirschbaum B, Simmonds HA. Methotrexate inhibits the first committed step of purine biosynthesis in mitogen-stimulated human T-lymphocytes: a metabolic basis for efficacy in rheumatoid arthritis? *Biochem. J.* **1999**, 342, 143-152.

Fanali G, di Masi A, Trezza V, Marino M, Fasano M, Ascenzi P. Human serum albumin: from bench to bedside. *Mol. Aspects Med.* **2012**, 33, 209-290.

Farber S, Diamond LK. Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroxy-glutamic acid. *N. Engl. J. Med.* **1948**, 238, 787-793.

Fehske KJ, Schläfer U, Wollert U, Müller WE. Characterization of an important drug binding area on human serum albumin including the high-affinity binding sites of warfarin and azapropazone. *Mol. Pharmacol.* **1982**, 21, 387-393.

Garcovich M, Zocco MA, Gasbarrini A. Clinical use of albumin in hepatology. *Blood Transfus.* **2009**, 7, 268-277.

Gerards AH, de Lathouder S, de Groot ER, Dijkmans BAC, Aarden LA. Inhibition of cytokine production by methotrexate. Studies in healthy volunteers and patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* **2003**, 1189-1196.

Gilman A. The initial clinical trial of nitrogen mustard. *Am. J. Surg.* **1963**, 105, 574-578.

Gubner R, August S, Ginsberg V. Therapeutic suppression of tissue reactivity. II. Effect of aminopterin in rheumatoid arthritis and psoriasis. *Am. J. Med. Sci.* **1951**, 222, 176-182.

Guo D, Liu Y. Supramolecular chemistry of p-sulfonatocalix[n]arenes and its biological applications. *Acc. Chem. Res.* **2014**, 47, 1925-1934.

Hamon F, Djedaini-Pilard F, Barbot F, Len C. Azobenzenes-synthesis and carbohydrate applications. *Tetrahedron* **2009**, 65, 10105–10123.

Hayashi H, Tazoe Y, Tsuboi S, Horino M, Morishita M., Arai T, Ohshima M, Matsuyama T, Kosuge K., Yamada H, Tsuji D, Inoue K, Itoh K. A single nucleotide polymorphism of reduced folate carrier 1 predicts methotrexate efficacy in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Drug. Metab. Pharmacokinet.* **2013**, 28, 164-168.

Heinecke JW. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis* **1998**, 141, 1-15.

Howard SC, McCormick J, Pui C, Buddington RK, Harvey RD. Preventing and Managing Toxicities of High-Dose Methotrexate. *Oncologist* **2016**, 21, 1471-1482.

Huang W, Yang P, Chang Y, Marquez VE, Chen C. Methotrexate induces apoptosis through p53/p21-dependent pathway and increases E-cadherin expression through downregulation of HDAC/EZH2. *Biochem. Pharmacol.* **2011**, 81, 510-517.

Huckvale R, Mortensen M, Pryde D, Smart TG, Baker JR. Azogabazine; a photochromic antagonist of the GABA_A receptor. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, 14, 6676-6678.

Hynes JB, Pathak A, Panes CH, Okeke CC. Direct synthesis of 2,4-diaminoquinazolines from 2-fluorobenzonitriles. *J. Heterocyclic. Chem.* **1988**, 25, 1173– 1177.

Ishtikhar M, Ali MS, Atta AM, Al-Lohedan H, Badr G, Khan RH. Temperature dependent rapid annealing effect induces amorphous aggregation of human serum albumin. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, 82, 844-855.

Kamal JKA, Zhao L, Zewail AH. Ultrafast hydration dynamics in protein unfolding: human serum albumin. *Prot. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, 101, 13411-13416.

Khan MA, Khan H, Tariq SA, Pervez S. In vitro attenuation of thermal-induced protein denaturation by aerial parts of *Artemisia scoparia*. *JEBCAM*. **2015**, 20, 9-12.

Kieseier BC, Jeffery DR. Chemotherapeutics in the treatment of multiple sclerosis. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* **2010**, 3, 277-297.

Kissinger HE. Reaction kinetics in differential thermal analysis. *Anal. Chem.* **1957**, 29, 1702-1706.

Kouoh F, Gressier B, Luyckx M, Brunet C, Dine T, Cazin M, Cazin JC. Antioxidant properties of albumin: effect on oxidative metabolism of human neutrophil granulocytes. *Farmaco*. **1999**, 54, 695-699.

Kragh-Hansen U, Chuang VTG, Otagiri M. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, 25, 695-704.

Kwong Y, Yeung DYM, Chan JCW. Intrathecal chemotherapy for hematologic malignancies: drugs and toxicities. *Ann. Hematol.* **2009**, 88, 193-201.

Larsen MT, Kuhlmann M, Hvam ML, Howard KA. Albumin-based drug delivery: harnessing nature to cure disease. *Mol. Cell Ther.* **2016**, 27.

Lems W, Boers M, van Vollenhoven RF, Nurmohamed M. Antirheumatic drugs for cardiovascular disease prevention: The case for colchicine. *RMD Open* **2021**, 7, e001560.

Levêque D, Santucci R, Gourieux B, Herbrecht R. Pharmacokinetic drug-drug interactions with methotrexate in oncology. *Expert. Rev. Clin. Pharmacol.* **2011**, 4, 743-750.

Li JC, Kaminskas E. Accumulation of DNA strand breaks and methotrexate cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1984**, 81, 5694-5698.

Li Q, Yang W, Qu L, Qi H, Huang Y, Zhang Z. Interaction of Warfarin with Human Serum Albumin and Effect of Ferulic Acid on the Binding. *J. Spectrosc.* **2014**.

Lie E, Uhlig T, van der Heijde D, Rødevand E, Kalstad S, Kaufmann C, Mikkelsen K, Kvien TK. Effectiveness of sulfasalazine and methotrexate in 1102 DMARD-naïve patients with early RA. *Rheumatology* **2012**, 51, 670-678.

Liu F, Helgeson RC, Houk KN. Building on Cram's Legacy: Stimulated Gating in Hemicarcerands. *Acc Chem Res.* **2014**, 47, 2168-2176.

Lopez-Olivo MA, Siddhanamatha HR, Shea B, Tugwell P, Wells GA, Suarez-Almazor ME. Methotrexate for treating rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2014**, CD000957.

Mashita T, Kowada T, Takahashi H, Matsui T, Mizukami S. Light-wavelength based Quantitative Control of Dihydrofolate Reductase Activity Using Photochromic Isostere of Inhibitor. *ChemBioChem* **2019**, 20, 1382–1386.

Mastropaoletti D, Camerman A, Camerman N. Folic acid: crystal structure and implications for enzyme binding. *Science*. **1980**, 210, 334-336.

Matera C, Gomila AMJ, Camarero N, Libergoli M, Soler C, Gorostiza P. Photoswitchable Antimetabolite for Targeted Photoactivated Chemotherapy. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, 140, 15764-15773.

McMenamy RH, Oncley JL. The specific binding of L-tryptophan to serum albumin. *J. Biol. Chem.* **1958**, 233, 1436-1447.

Micha R, Imamura F, von Ballmoos MW, Solomon DH, Hernán MA, Ridker PM, Mozaffarian D. Systematic review and meta-analysis of methotrexate use and risk of cardiovascular disease. *Am. J. Cardiol.* **2011**, 108, 1362–1370.

Mikkelsen TS, Sparreboom A, Cheng C, Zhou Y, Boyett JM, Raimondi SC, Panetta JC, Bowman WP, Sandlund JT, Pui C, Relling MV, Evans WE. Shortening infusion time for high-dose methotrexate alters antileukemic effects: a randomized prospective clinical trial. *J. Clin. Oncol.* **2011**, 29, 1771-1778.

Montesinos MC, Desai A, Cronstein BN. Suppression of inflammation by low-dose methotrexate is mediated by adenosine A_{2A} receptor but not A₃ receptor activation in thioglycollate-induced peritonitis. *Arthritis Res. Ther.* **2006**, 8.

Montesinos MC, Desai A, Delano D, Chen J, Fink JS, Jacobson MA, Cronstein BN. Adenosine A_{2A} or A₃ receptors are required for inhibition of inflammation by methotrexate and its analog MX-68. *Arthritis Rheum.* **2003**, 48, 240-247.

Montesinos MC, Yap JS, Desai A, Posadas I, McCrary CT, Cronstein BN. Reversal of the antiinflammatory effects of methotrexate by the nonselective adenosine receptor antagonists theophylline and caffeine: evidence that the antiinflammatory effects of methotrexate are mediated via multiple adenosine receptors in rat adjuvant arthritis. *Arthritis Rheum.* **2000**, 43, 656-663.

Moss GP, Smith PAS, Tavernier D. Glossary of class names of organic compounds and reactivity intermediates based on structure (IUPAC Recommendations 1995). *Pure Appl. Chem.* **1995**, 67, 1307-1375.

Nagymihály Z, Wölfling J, Schneider Gy, Kollár L. Synthesis of 2-methylresorcinol-based deepened cavitands with chiral inlet bearing steroidal moieties on the upper rim. *ChemistrySelect*, **2020**, 5, 6933-6938.

Neda I, Vollbrecht A, Grunenberg J, Schmutzler R. Functionalization of the periphery of calix[4]resorcinarenes with P(III)-containing substituents via hydroxy, trimethylsiloxy, and ethoxy-tethered trimethylsiloxy intermediates. *Heteroatom Chem.* **1998**, 9, 553-558.

Nicholson JP, Wolmarans MR, Park GR. The role of albumin in critical illness. *Br. J. Anaesth.* **2000**, 85, 599-610.

Nimsea SB, Kim T. Biological applications of functionalized calixarenes. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 366-386.

Ortiz Z, Shea B, Suarez-Almazor ME, Moher D, Wells GA, Tugwell P. The efficacy of folic acid and folinic acid in reducing methotrexate gastrointestinal toxicity in rheumatoid arthritis. A metaanalysis of randomized controlled trials. *J. Rheumatol.* **1998**, 25, 36-43.

Otagiri M. A molecular functional study on the interactions of drugs with plasma proteins. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2005**, 20, 309-323.

Pande AR, Ando K, Ishikura R, Nagami Y, Ogawa M, Kamikonya N, Kaneda Y, Tanizawa T, Nakao N. Disseminated necrotizing leukoencephalopathy following chemoradiation therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Radiat. Med.* **2006**, 24, 515-519.

Panja S, Khatua DK, Halder M. Simultaneous binding of folic acid and methotrexate to human serum albumin: insights into the structural changes of protein and the location and competitive displacement of drugs. *ACS Omega* **2018**, 246-253.

Pascu ML, Staicu A, Voicu L, Brezeanu M, Carstocea B, Pascu R, Gazdaru D. Methotrexate as a photosensitiser. *Anticancer Res.* **2004**, 24, 2925-2930.

Pattarino F, Giovannelli L, Giovenzana GB, Rinaldi M, Trotta M. Inclusion of methotrexate in alkyl-cyclodextrins: effects of host substitutents on the stability of complexes. *J. Drug Del. Sci. Tech.* **2005**, 15, 465–468.

Petroselli M, Rebek Jr J, Yu Y. Highly Selective Radical Monoreduction of Dihalides Confined to a Dynamic Supramolecular Host. *Chemistry* **2021**, 27, 3284-3287.

Plard C, Bressolle F, Fakhoury M, Zhang D, Yacouben K, Rieutord A, Jacqz-Aigrain E. A limited sampling strategy to estimate individual pharmacokinetic parameters of methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2007**, 60, 609-620.

Presas A, Brissos RF, Caballero AB, Borilovic I, Korrodi-Gregório L, Pérez-Tomás R, Roubeau O, Gamez P. Photoswitching the cytotoxic properties of platinum(II) compounds. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2015**, 54, 4561-4565.

Puig L. Methotrexate: new therapeutic approaches. *Actas Dermosifiliogr.* **2014**, 105, 583-589.

Renner C, Moroder L. Azobenzene as conformational switch in model peptides. *ChemBioChem* **2006**, 7, 868-878.

Rosenbaum EG, Roat JW, Gao L, Yang R-F, Manickam DS, Yin J-X, Schultz HD, Bronich TK, Batrakova EV, Kabanov AV, Zucker IH, Zimmerman MC. The attenuation of central angiotensin II-dependent pressor response and intra-neuronal signaling by intracarotid injection of nanoformulated copper/zinc superoxide dismutase. *Biomaterials* **2010**, 31, 5218–5226.

Rozga J, Piatek T, Małkowski P. Human albumin: old, new, and emerging applications. *Ann. Transplant.* **2013**, 18, 205–217.

Sabry SM, Abdel-Hady M, Elsayed M, Fahmy OT, Maher HM. Study of stability of methotrexate in acidic solution Spectrofluorimetric determination of methotrexate in pharmaceutical preparations through acid-catalyzed degradation reaction. *J. Pharmaceut. Biomed.* **2003**, 32, 409-423.

Saijo N. Present status and problems on molecular targeted therapy of cancer. *Cancer Res. Treat.* **2012**, 44, 1-10.

Saso L, Valentini G, Casini ML, Grippa E, Gatto MT, Leone MG, Silvestrini B. Inhibition of heat-induced denaturation of albumin by nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs): Pharmacological implications. *Arch. Pharm. Res.* **2001**, 24, 150-158.

Schmiegelow K. Advances in individual prediction of methotrexate toxicity: a review. *Brit. J. Haematol.* **2009**, 146, 489-503.

Schönberger M, Trauner D. A photochromic agonist for μ -opioid receptors. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, 53, 3264-3267.

Senapati S, Mahanta AK, Kumar S, Maiti P. Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance. *Signal Transduct. Target Ther.* **2018**, 3.

Shalaeva YV, Morozova JE, Syakaev VV, Ermakova AM, Nizameev IR, Kadirov MK, Kazakova EK, Konovalov AI. Formation of cooperative amidoaminocalixresorcinarene-methotrexate nanosized aggregates in an aqueous solution and on the surface of gold nanoparticles. *Supramol. Chem.* **2018**, 30, 901–910.

Shams S, Martinez JM, Dawson JRD, Flores J, Gabriel M, Garcia G, Guevara A, Murray K, Pacifici N, Vargas MV, Voelker T, Hell JW, Ashouri JF. The Therapeutic Landscape of Rheumatoid Arthritis: Current State and Future Directions. *Front. Pharmacol.* **2021**, 12.

Sherman J. Molecules that can't resist templation. *Chem. Commun.* **2003**, 14, 1617-1623.

Siewertsen R, Neumann H, Buchheim-Stehn B, Herges R, Näther C, Renth F, Temps F. Highly efficient reversible Z-E photoisomerization of a bridged azobenzene with visible light through resolved S(1)(n pi*) absorption bands. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 15594-15595.

Sirotnak FM, Moccio DM, Yang CH. A novel class of genetic variants of the L1210 cell up-regulated for folate analogue transport inward. Isolation, characterization, and degree of metabolic instability of the system. *J Biol Chem.* **1984**, 259, 13139-13144.

Stover PJ, One-carbon metabolism-genome interactions in folate-associated pathologies. *J. Nutr.* **2009**, 139, 2402-2405.

Sudlow G, Birkett DJ, Wade DN. The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol. Pharmacol.* **1975**, *11*, 824-832.

Szymański W, Beierle JM, Kistemaker HAV, Velema WA, Feringa BL. Reversible photocontrol of biological systems by the incorporation of molecular photoswitches. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 6114-6178.

Tardif J, Kouz S, Waters DD, Bertrand OF, Diaz R, Maggioni AP, Pinto FJ, Ibrahim R, Gamra H, Kiwan GS, Berry C, López-Sendón J, Ostadal P, Koenig W, Angoulvant D, Grégoire JC, Lavoie M, Dubé M, Rhainds D, Provencher M, Blondeau L, Orfanos A, L'Allier PL, Guertin M, Roubille F. Efficacy and safety of low-dose colchicine after myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *381*, 2497–2505.

Teresi ME, Crom WR, Choi KE, Mirro J, Evans WE. Methotrexate bioavailability after oral and intramuscular administration in children. *J Pediatr.* **1987**, *110*, 788-792.

Thanigaimani S, Phie J, Krishna SM, Moxon J, Golledge J. Effect of disease modifying anti-rheumatic drugs on major cardiovascular events: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 6627.

Tian H, Cronstein BN. Understanding the mechanisms of action of methotrexate: implications for the treatment of rheumatoid arthritis. *Bull. NYU Hosp. Jt. Dis.* **2007**, *65*, 168-173.

Walling J. From methotrexate to pemetrexed and beyond. A review of the pharmacodynamic and clinical properties of antifolates. *Invest. New Drugs* **2006**, *24*, 37-77.

Widemann BC, Adamson PC. Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. *Oncologist* **2006**, *11*, 694-703.

Widemann BC, Schwartz S, Jayaprakash N, Christensen R, Pui C, Chauhan N, Daugherty C, King TR, Rush JE, Howard SC. Efficacy of glucarpidase (carboxypeptidase g2) in patients with acute kidney injury after high-dose methotrexate therapy. *Pharmacotherapy* **2014**, *34*, 427-439.

Yamasaki K, Maruyama T, Kragh-Hansen U, Otagiri M. Characterization of site I on human serum albumin: concept about the structure of a drug binding site. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1295*, 147-157.

Yélamos O, Puig L. Systemic methotrexate for the treatment of psoriasis. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **2015**, *11*, 553-563.

Zimmerman MC, Clemens DL, Duryee MJ, Sarmiento C, Chiou A, Hunter CD, Tian J, Klassen LW, O'Dell JR, Thiele GM, Mikuls TR, Anderson DR. Direct antioxidant

properties of methotrexate: Inhibition of malondialdehyde-acetaldehyde-protein adduct formation and superoxide scavenging. *Redox Biol.* **2017**, 13, 588–593.

10. Saját közlemények listája

10.1. Jelen dolgozat 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]

A dolgozat alapjául szolgáló cikkek összesített impakt faktora: 21,807

Kumulatív impakt faktor: 22,692

10.2. Jelen dolgozat 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).

10.3. 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]

10.4. 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).

10.5. 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.

11. 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 Józsefnak a PHX szintetizálását. Köszönettel tartozom Dr. Hartvig Nórának és Dr. Bognár Baláznak 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.



Effect of methotrexate and its photodegradation products on the temperature induced denaturation of human serum albumin



Zsolt Preisz ^{a,b}, Sándor Kunsági-Máté ^{a,b,c,*}

^a Department of General and Physical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Pécs, Ifjúság 6, H-7624 Pécs, Hungary

^b Institute of Organic and Medicinal Chemistry, Medical School, University of Pécs, Szigeti 12, H-7624 Pécs, Hungary

^c János Szentágothai Research Center, University of Pécs, Ifjúság 20, H-7624 Pécs, Hungary

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 March 2020

Received in revised form 25 August 2020

Accepted 29 August 2020

Available online 3 September 2020

Keywords:

Methotrexate

Human serum albumin

Denaturation

Microcalorimetry

Spectrofluorimetry

Anticancer

Anti-inflammatory

Kissinger method

ABSTRACT

Effect of the photodegradation of chemotherapeutic agent methotrexate on the denaturation of human serum albumin has been studied by differential scanning calorimetry and fluorimetric measurements. Photoluminescence studies highlighted entropy driven binding of both methotrexate molecules and its degradation products to the albumin molecules. The calorimetric measurements evaluated by the Kissinger method show elevated activation energy in the presence of methotrexate. Similar but moderated enhancement of the activation energy was obtained in the presence of the photodegradation products of methotrexate. These results highlight stabilization of the human serum albumin by the methotrexate drug which finding may contribute to fine tuning of methotrexate applications in therapy.

© 2020 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Methotrexate (4-amino-10-methylfolic acid, MTX) is a dihydrofolate reductase (DHFR) inhibitor. It is widely used as chemotherapeutic drug in rheumatoid arthritis (RA), psoriasis and some sorts of leukaemia. It decreases the concentration of tetrahydrofolate (THF) in the cells by the inhibition of DHFR, therefore it reduces the purine nucleotide and DNA synthesis [1]. Other mechanisms of action were also mentioned in the literature, including reduction of antigen-dependent T-cell proliferation, promotion of adenosine release and suppression of transmethylation reaction [2,3].

MTX is a relatively well-known molecule and is a first-line antirheumatic drug because of its efficacy and safety [4]. It is as potent as new biological immunomodifier agents and low-dose MTX has mild and self-limited adverse effects [5]. To reduce these adverse effects it is commonly used in combination either with small-molecule drugs or new biological agents [6].

MTX is a photosensitive drug, UV-light exposure causes photodissociation of the molecule. Pascu et al. described the modifications in the absorption and fluorescence characteristics of MTX solution caused by UV-light (Fig. 1.) [7,8]. Hsu et al. observed several pathways of the self-sensitized photodegradation of MTX under simulated solar irradiation [9].

Human serum albumin (HSA) is a protein that is synthesized in the liver and its normal serum concentration is 3.5 g/dL to 5 g/dL, so it is the most abundant human serum protein [10]. It plays important role both as transport and depot molecule, because many endogenous (e.g. bilirubin) and exogenous molecules (e.g. drug molecules) can bind to one or more of its several binding sites. Interaction with albumin has a big impact on the pharmacokinetics of many therapeutic agents, it can increase solubility and decrease toxicity. Distribution and elimination can also be regulated through binding to albumin [11].

MTX also binds to HSA, its primary binding site is on subdomain IIA and its secondary binding site is on subdomain IIIA [12]. MTX-HSA interaction has been studied from many aspects and with many analytical methods in the past thirty years [12,13]. The conformational change of HSA through this interaction was described, and the competition on the binding sites between MTX and other drug molecules was also investigated earlier [14,15].

* Corresponding author at: Institute of Organic and Medicinal Chemistry, Medical School, University of Pécs, Szigeti 12, H-7624 Pécs, Hungary.

E-mail addresses: preisz.zsolt@pte.hu (Z. Preisz), [\(S. Kunsági-Máté\)](mailto:sandor.kunsagi-mate@aok.pte.hu).

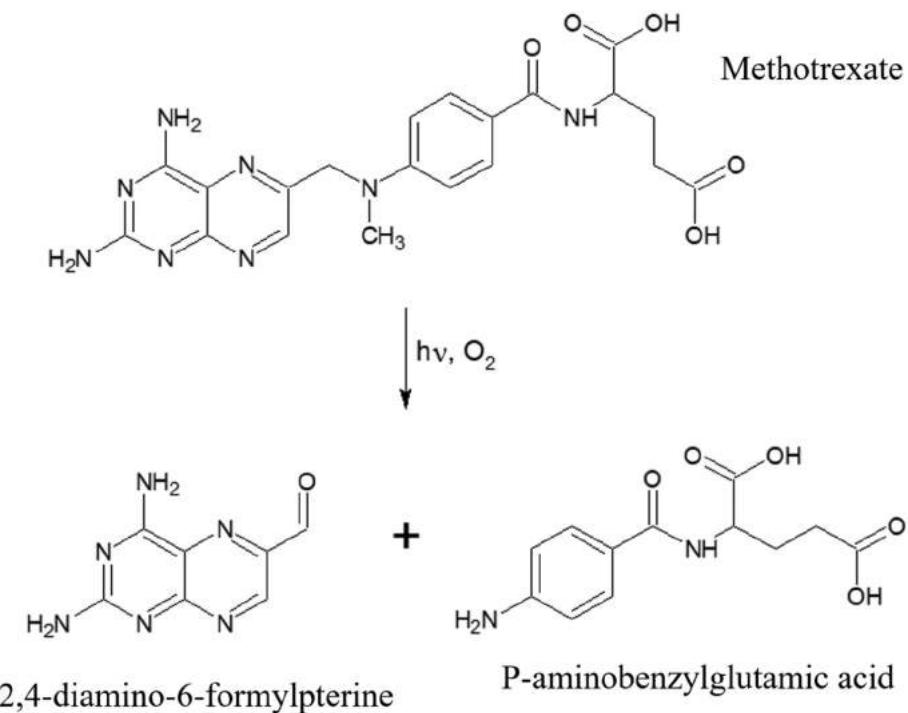


Fig. 1. The photodissociation of methotrexate according to Pascu et al. [7].

However, the effect of photodegradation of MTX on the denaturation of HSA was not completely revealed yet. The stability (denaturation and renaturation) of proteins plays an important role in some human diseases (e.g. Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's disease), therefore it is an intensively researched field [16–18]. In this work the denaturation of HSA has been studied in the presence of MTX and its photodissociation products by measuring the thermodynamic and kinetic parameters (enthalpy and entropy changes and the activation energy) associated to the conformation change of HSA during denaturation transition. Microcalorimetry measurements were applied to determine the thermodynamic parameters and the photodegradation of MTX was followed by photoluminescence and UV/Vis spectroscopy.

2. Materials and methods

Methotrexate (MTX) and Human serum albumin (HSA) were obtained from Sigma-Aldrich. All other chemicals (analytical grade) were purchased from VWR International Ltd. The applied solvent was phosphate-buffered saline (PBS), composed by NaCl (137 mmol/L), KCl (2.7 mmol/L), NaH₂PO₄ (8 mmol/L), and K₂HPO₄ (1.5 mmol/L) dissolved in ultraclean water (Adrona, conductivity <0.1 μS/cm). PBS was adjusted to pH 7.4 with NaOH.

1 mM stock solutions of MTX was prepared in PBS, then stored at 4 °C and protected against light. For the fluorescence and microcalorimetric measurements 4.5 × 10⁻⁴ M MTX and HSA solutions were used.

Fluorimetric measurements were performed with a Fluorolog τ3 spectrofluorimeter (Jobin-Yvon/SPEX) either to follow the progress of the reaction or also to reach the complete degradation of MTX. Fluorescence spectra were recorded using 302 nm excitation wavelength, 351 nm and 458 nm emission peaks were used for data evaluation.

To determine the thermodynamic parameters associated to the binding of MTX and photodegraded MTX onto the HSA the temperature dependence of binding constants was measured. Accordingly, samples with different concentrations of MTX (0–450 μM) and with constant concentration of HSA (1 μM) were prepared and measured using 371 nm excitation wavelength at temperatures 288 K, 293 K, 298 K, 303 K, 308 K.

Microcalorimetric measurements were carried out employing a microSC (Setaram Instrumentation) microcalorimeter. Data were evaluated with Calisto Thermal Analysis Software (Setaram Instrumentation). PBS as reference and the sample were loaded into the appropriate (sample and reference) cells (volume = 0.500 mL), respectively. Samples were scanned at 0.5–1.2 K/min between 293 K and 373 K.

3. Calculation

Molecular weight of 66.437 kDa for HSA was used during the evaluation of data recorded.

Activation energies (E_a) were calculated by the Kissinger method [19,20], where the slope of the line fitted to the measured $\ln\left(\frac{H_r}{RT_{max}^2}\right)$ data (where H_r is the heating rate in K/s, R is the gas constant and T_{max} is the denaturation temperature) plotted against $1/T_{max}$ is equal to E_a/R . The activation energy associated to the transition of the HSA can then be expressed as follows:

$$\ln\left(\frac{H_r}{RT_{max}^2}\right) = -\left(\frac{E_a}{RT_{max}}\right) + \ln\left(\frac{R \cdot A}{E_a}\right); E_a = R \cdot \text{slope}. \quad (1)$$

Mention here, that the Kissinger's equation above (Eq.(1).) has the following limitations: it is assumed that both the frequency factor A and the activation energy E_a are constant in the temperature range of the experiments, and the reaction follows the first order kinetics.

The stability constant (K) of HSA-MTX and HSA-photodegraded MTX was calculated at several temperatures with the application of the Benesi-Hildebrand equation:

$$\frac{1}{I-I_0} = \frac{1}{[MTX] \cdot [HSA] \cdot K} + \frac{1}{[MTX]} \quad (3)$$

where I is the intensity of the sample containing HSA and MTX or photodegraded MTX, and I_0 is the fluorescence intensity of HSA solution in the absence of other reactants.

Thermodynamic parameters, ΔH (enthalpy change) and ΔS (entropy change) have been determined by the van 't Hoff equation: the

$\ln K$ values determined above by the Benesi-Hildebrand method were then plotted against the reciprocal temperatures ($1/K$) and the ΔH and ΔS have been calculated from the slope and the intercept of the line fitted to the experimental values:

$$\ln K = -\frac{\Delta G}{RT} = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (4)$$

where ΔG is the Gibbs free energy change.

4. Results

To determine the effect of photodegradation of MTX on the denaturation of HSA the following steps been performed:

- preparing the photodegradation products by illuminating the MTX solutions, following the reactions and recording the spectroscopic properties of the products
- determining the binding efficiency of the MTX and its photodissociation products to the HSA
- evaluating the transition thermodynamics and kinetics of the HSA unfolding.

The ii) step is necessary to analyze how the possible different binding properties of MTX and its photodissociation products towards the HSA affect the transition thermodynamics and kinetics examined in step iii).

4.1. Photodegradation of methotrexate

Due to the aim of our work to compare the effect of MTX and its photodissociation products on the unfolding of HSA, the photodissociation of MTX was performed first. Excitation at 302 nm and at 298 K was applied and the dissociation reaction was followed and the completeness confirmed by photoluminescence measurements. Fig. 2. summarizes the results and highlights that the reaction with the given setup was completed after about 4000 min.

4.2. Binding thermodynamics of MTX and its photodegradation products on HSA

Fluorimetric measurements were performed to investigate the temperature dependence of the interaction of MTX and photodegraded MTX with HSA, samples with different concentrations of MTX and the products of the photodegradation of MTX (0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 μM) with constant concentration of HSA (1 μM) were prepared and measured. Emission spectra were recorded under excitation at 371 nm wavelength applying temperatures of 288 K, 293 K, 298 K, 303 K, 308 K. 455 nm emission peak was then used for data evaluation (Fig. 3.). In the absence of MTX and at low MTX concentrations a peak is observable at 425 nm in Fig. 3A that disappears at higher MTX concentrations. Presumably, it is the fluorescence signal of HSA that is quenched during the complex formation.

After determining the enthalpy and entropy changes by the van 't Hoff equation (Eq. (4)), the free enthalpy changes were also

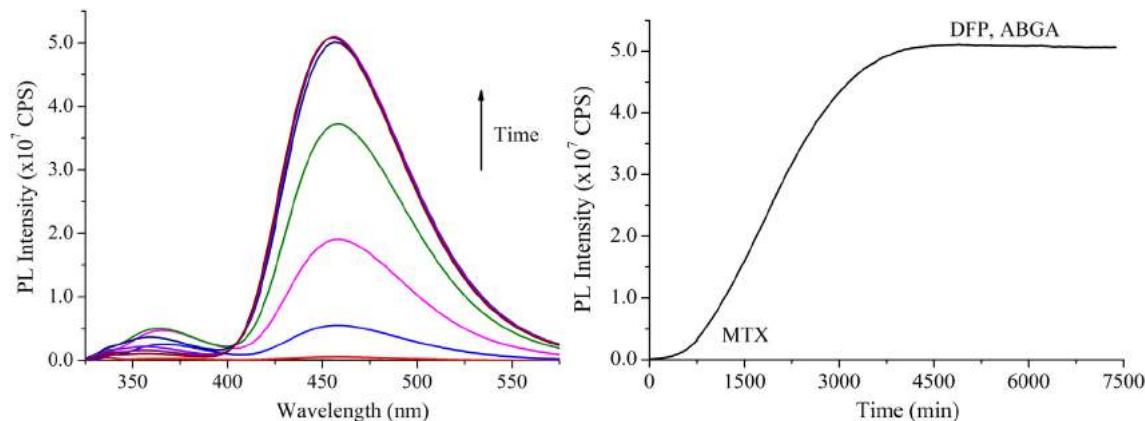


Fig. 2. Fluorescence spectra of MTX solution after excited at 302 nm (A) and the emmision intensity of the peak at 458 nm plotted against the reaction time (B).

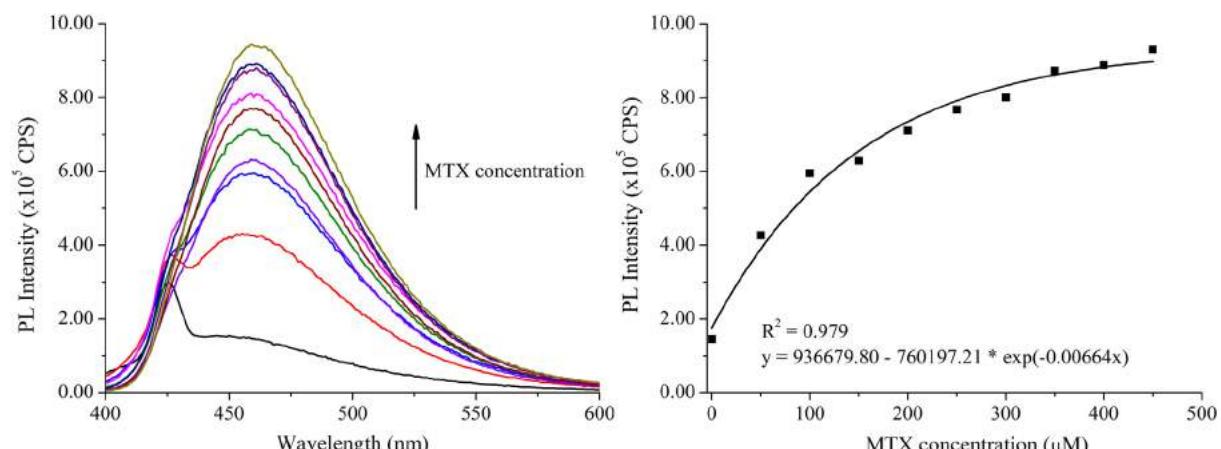


Fig. 3. Fluorescence spectra of 1 μM HSA solution in the absence and presence of MTX (0–500 μM , $\lambda_{\text{exc}} = 371 \text{ nm}$) (A) and the emmision intensity of the peak at 455 nm plotted against the concentration of MTX (B).

Table 1

Comparison of the decimal logarithms of the association constants of the complexation between MTX and HSA, and the photodegradation products of MTX and HSA.

Temperature (K)	MTX-HSA	Photodegraded MTX-HSA
	logK	logK
288	3.91 ± 0.63	3.74 ± 0.49
293	4.01 ± 0.52	3.74 ± 0.41
298	4.03 ± 0.75	3.72 ± 0.35
303	4.02 ± 0.51	3.65 ± 0.40
308	4.18 ± 0.16	3.59 ± 0.38

calculated for room temperature and for the temperature of the thermal denaturation of HSA. The results are summarized in Table 1, Table 2 and Fig. 4.

Results reflect the weak temperature dependence of binding constants for both the MTX and its photodissociated products to the HSA. This property highlights that low enthalpy changes are associated to the binding process. Instead, the considerable negative Gibbs free energy changes are due to the entropy enhancement during the binding process, which can be described by the dehydration of the species interacted prior the molecular association.

Quantitatively, binding constants and the thermodynamic parameters reflects that within the range of the DSC measurements (288 K–353 K) more than 99.99% of the MTX and its photodissociation products are bound to HSA. It means that although this binding is a weak interaction, we can consider that the concentration of HSA-MTX or HSA-DFP, ABGA remains constant by elevating the temperature during the DSC measurements. Therefore, the dissociation of MTX from HSA can be neglected and this property confirms that the results of the DSC measurements have not been affected by the dissociation of the HSA-drug complexes.

Table 2

Comparison of the free enthalpy changes of the complex formation between MTX and HSA, and the photodegradation products of MTX and HSA.

Temperature (K)	MTX-HSA ΔG (kJ/mol)	Photodegraded MTX-HSA ΔG (kJ/mol)
288	-21.532	-30.512
353	-31.638	-34.474

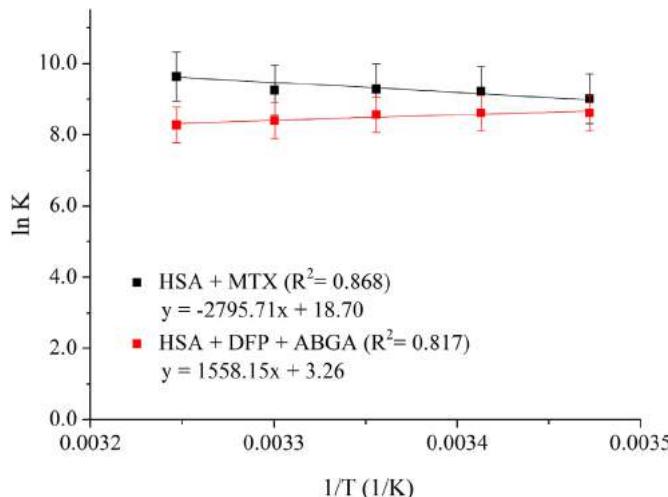


Fig. 4. Van 't Hoff plot of the binding constants associated to the MTX-HSA and photodegraded MTX-HSA interactions.

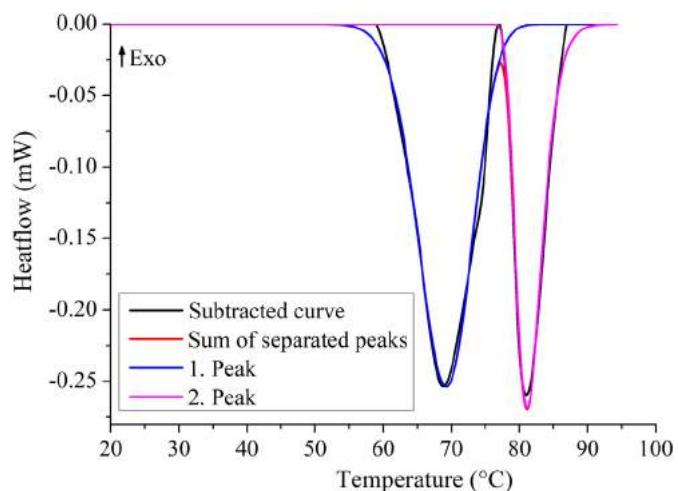


Fig. 5. The subtracted baseline and separated peaks of a termogram of the thermal denaturation of 450 μM HSA in the presence of 450 μM MTX.

4.3. DSC measurements

DSC curves associated to the unfolding of HSA were recorded with different scan rates (0.5, 0.8, 1 and 1.2 K/min) in the absence and in the presence of MTX and its photodissociation products DFP and ABGA. Applying the Kissinger's method, the thermodynamic (enthalpy ΔH and entropy ΔS change) and kinetic (activation energy E_a) parameters associated to the thermal denaturation of HSA were determined. Two denaturation peaks were observed in all curves (Fig. 5.). The first peak was investigated in all cases. Fig. 6. depicts the Kissinger plots of the unfolding of HSA in the absence and in the presence of MTX and in the presence of DFP and ABGA. Kamal et al. [21] investigated the stability of the different domains of HSA and proposed that domains II and III have nearly the same stability and are responsible for protein functions (e.g. substrate binding), and the least active and most stable domain I contributes to protein stability. We suggest that the first peak of the termogram of the thermal denaturation of HSA represents the unfolding of domains II and III and the second peak represents the unfolding of domain I. This is also confirmed by the insignificant changes in the second peak in the presence of MTX, because the two binding sites of MTX are on domains IIA and IIIA. Mention here that presence of fatty acids enhances both peaks in DSC curves [22].

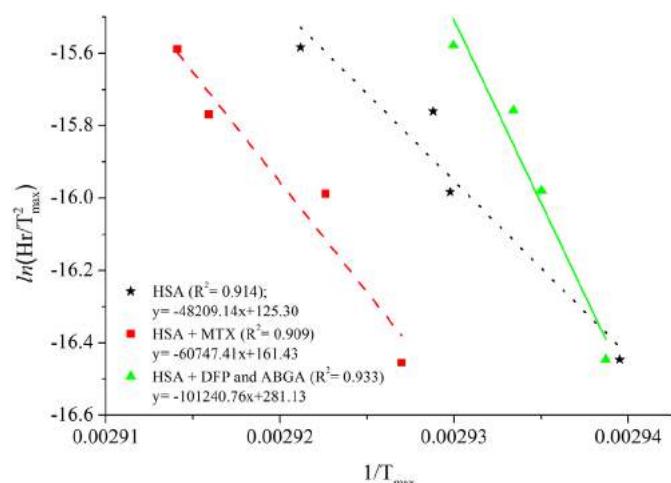


Fig. 6. Kissinger's plots of the kinetic parameters of samples containing HSA (dotted line), HSA + MTX (dashed line) and HSA + DFP-ABGA (solid line).

Table 3

Activation energies associated with the unfolding of HSA in the investigated samples.

	Activation energy (kJ/mol)
450 μM HSA	400.81
450 μM HSA + 450 μM MTX	505.05
450 μM HSA + 450 μM DFP-ABGA	841.71

Table 3 summarizes the activation energies of HSA unfolding in the samples. The activation energy increases significantly in the presence of MTX and doubles in the presence of DFP and ABGA, indicating that the unfolding reaction of HSA is kinetically strongly affected by MTX and by its photodegradation products.

5. Conclusions

In this study, the thermal denaturation of HSA was investigated in the absence and presence of MTX and in the presence of the photodegradation products of MTX (DFP and ABGA). Thermodynamics of the complexation reaction of HSA with MTX, and also of HSA with photodegraded MTX was investigated and the results displayed a weak temperature dependence.

MTX was found to increase the activation energy of the thermal denaturation of HSA. This effect is even more pronounced for DFP and ABGA, the binding of which more than doubles the activation energy of protein denaturation. We can therefore conclude that MTX and its photodegradation products enhance the stability of the albumin and decrease its denaturation in the pharmacologically important range of temperature. Denatured proteins are considered as inflammatory mediators, so the inhibition of protein denaturation can cause anti-inflammatory effect. This effect can also belong to the many presumed mechanisms of action of MTX.

CRediT authorship contribution statement

Conceptualization, Zs. P. and S.K.-M.; methodology, Zs. P. and S.K.-M.; formal analysis, Zs. P.; investigation, Zs.P.; resources, S. K.-M.; data curation, Zs. P.; writing—original draft preparation, Zs.P. and S.K.-M.; writing—review and editing Zs.P. and S.K.-M;

Funding

This research received no external funding.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This work was supported by the GINOP-2.3.2-15-2016-00049 and 2019-2.1.11-TÉT-2019-00042 grants.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118905>.

References

- [1] H. Tian, B.N. Cronstein, Understanding the mechanisms of action of methotrexate, Bull. Hosp. Joint Dis. 65 (2007) 168–173 <http://hjdbulletin.org/files/archive/pdfs/532.pdf>.
- [2] E.S.L. Chan, B.N. Cronstein, Molecular action of methotrexate in inflammatory diseases, Arthritis Res. 4 (2002) 266–273, <https://doi.org/10.1186/ar419>.
- [3] M. Cutolo, A. Sulli, C. Pizzorni, B. Seriolo, Anti-inflammatory mechanisms of methotrexate in rheumatoid arthritis, Ann. Rheum. Dis. 60 (2001) 729–735, <https://doi.org/10.1136/ard.60.8.729>.
- [4] B. Friedman, B. Cronstein, Methotrexate mechanism in treatment of rheumatoid arthritis, Joint Bone Spine (2018) <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2018.07.004>.
- [5] B.N. Cronstein, Low-dose methotrexate: a mainstay in the treatment of rheumatoid arthritis, Pharmacol. Rev. 57 (2005) 163–172, <https://doi.org/10.1124/pr.57.2.3>.
- [6] K. Sharif, O. Gendelman, P. Langevitz, T. Reitblat, A. Watad, Y. Shoenfeld, J. Azuri, H. Amital, N.L. Bragazzi, O. Shovman, Efficacy and survival of golimumab with and without methotrexate in patients with psoriatic arthritis: a retrospective study from daily clinical practice, Best Pract. Res. Cl. Rh. (2019) <https://doi.org/10.1016/j.bepr.2019.02.012>.
- [7] M.L. Pascu, A. Staicu, L. Voicu, M. Brezeanu, B. Carstocea, R. Pascu, D. Gazzaru, Methotrexate as a photosensitiser, Anticancer Res. 24 (2004) 2925–2930 <http://ar.iarjournals.org/content/24/5A/2925.long>.
- [8] S.M. Sabry, M. Abdel-Hady, M. Elsayed, O.T. Fahmy, H.M. Maher, Study of stability of methotrexate in acidic solution Spectrofluorimetric determination of methotrexate in pharmaceutical preparations through acid-catalyzed degradation reaction, J. Pharmaceut. Biomed. 32 (2003) 409–423, [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(03\)00239-5](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(03)00239-5).
- [9] M.-H. Hsu, C.-J. Tsai, A. Yu-Chen Lin, Mechanism and pathways underlying the self-sensitized photodegradation of methotrexate under simulated solar irradiation, J. Hazard. Mater. 373 (2019) 468–475, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.03.095>.
- [10] T. Peters, All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications, first ed. Academic Press, London, UK, 1995 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-552110-9.X5000-4>.
- [11] U. Kragh-Hansen, V.T.G. Chuang, M. Otagiri, Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin, Biol. Pharm. Bull. 25 (2002) 695–704, <https://doi.org/10.1248/bpb.25.695>.
- [12] S. Panja, D.K. Khatua, M. Halder, Simultaneous binding of folic acid and methotrexate to human serum albumin: insights into the structural changes of protein and the location and competitive displacement of drugs, ACS Omega (2018) 246–253, <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01437>.
- [13] L.-Y. Cheng, M. Fang, A.-M. Bai, Y. Ouyang, Y.-J. Hu, Insights into the interaction of methotrexate and human serum albumin: a spectroscopic and molecular modeling approach, Luminescence 32 (2017) 873–879, <https://doi.org/10.1002/bio.3267>.
- [14] P. Coassolo, M. Valentin, M. Bourdeaux, C. Briand, Modification of human serum albumin binding of methotrexate by folic acid and certain drugs used in cancer chemotherapy, Eur. J. Clin. Pharmacol. 17 (1980) 123–127, <https://doi.org/10.1007/bf00562620>.
- [15] M. Maciążek-Jurczyk, A. Sułkowska, B. Bojko, J. Równicka, W.W. Sułkowski, Fluorescence analysis of competition of phenylbutazone and methotrexate in binding to serum albumin in combination treatment in rheumatology, J. Mol. Struct. 924–926 (2009) 378–384, <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2008.12.023>.
- [16] M. Ishtikhar, Z. Siddiqui, F.M. Husain, R.A. Khan, I. Hassan, Comparative refolding of guanidinium hydrochloride denatured bovine serum albumin assisted by cationic and anionic surfactants via artificial chaperone protocol: biophysical insight, Spectrochim. Acta A-M. 225 (2020) 117510, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117510>.
- [17] M. Ishtikhar, M.S. Ali, A.M. Atta, H. Al-Lohedan, G. Badr, R.H. Khan, Temperature dependent rapid annealing effect induces amorphous aggregation of human serum albumin, Int. J. Biol. Macromol. 82 (2016) 844–855, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.071>.
- [18] M. Ishtikhar, S.S. Usmani, N. Gull, G. Badr, M.H. Mahmoud, R.H. Khan, Inhibitory effect of copper nanoparticles on rosin modified surfactant induced aggregation of lysozyme, Int. J. Biol. Macromol. 78 (2015) 379–388, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.03.069>.
- [19] H.E. Kissinger, Reaction kinetics in differential thermal analysis, Anal. Chem. 29 (1957) 1702–1706, <https://doi.org/10.1021/ac60131a045>.
- [20] I. Ali, Misuse of pre-exponential factor in the kinetic and thermodynamic studies using thermogravimetric analysis and its implications, BioresourceTechnol. Rep. 2 (2018) 88–91, <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2018.04.011>.
- [21] J.K.A. Kamal, L. Zhao, A.H. Zewail, Ultrafast hydration dynamics in protein unfolding: human serum albumin, Prot. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101 (2004) 13411–13416, <https://doi.org/10.1073/pnas.0405724101>.
- [22] A. Michnik, K. Michalik, A. Kluczecka, Z. Drzazga, Comparative DSC study of human and bovin serum albumin, J. Therm. Anal. Cal. 84 (2006) 113–117, <https://doi.org/10.1007/s10973-005-7170-1>.



Article

Weak Interactions of the Isomers of Phototrexate and Two Cavitand Derivatives

Zsolt Preisz ^{1,2}, Zoltán Nagymihály ^{3,4}, László Kollár ^{3,4}, Tamás Kálai ^{1,3} and Sándor Kunsági-Máté ^{1,3,*}

¹ Faculty of Pharmacy, Institute of Organic and Medicinal Chemistry, University of Pécs, Szigeti 12, 7624 Pécs, Hungary; preisz.zsolt@pte.hu (Z.P.); tamas.kalai@aok.pte.hu (T.K.)

² Department of Physical Chemistry and Materials Science, Faculty of Sciences, University of Pécs, Ifjúság 6, 7624 Pécs, Hungary

³ János Szentágóthai Research Center, University of Pécs, Ifjúság 20, 7624 Pécs, Hungary; nmzoltan@gamma.ttk.pte.hu (Z.N.); kollar@gamma.ttk.pte.hu (L.K.)

⁴ Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Sciences, University of Pécs, Ifjúság 6, 7624 Pécs, Hungary

* Correspondence: sandor.kunsagi-mate@aok.pte.hu

Abstract: The interactions of two conformers of newly synthesized photoswitchable azobenzene analogue of methotrexate, called Phototrexate, with two cavitand derivatives, have been investigated in dimethyl sulfoxide medium. Photoluminescence methods have been applied to determine the complex stabilities and the related enthalpy and entropy changes associated to the complex formation around room temperature. Results show opposite temperature dependence of complex stabilities. The structure of the upper rims of the host molecules and the reordered solvent structure were identified as the background of the opposite tendencies of temperature dependence at molecular level. These results can support the therapeutic application of the photoswitchable phototrexate, because the formation of inclusion complexes is a promising method to regulate the pharmacokinetics of drug molecules.

Keywords: Phototrexate; cavitand; chemotherapy; inclusion complex; thermodynamics; fluorescence



Citation: Preisz, Z.; Nagymihály, Z.; Kollár, L.; Kálai, T.; Kunsági-Máté, S. Weak Interactions of the Isomers of Phototrexate and Two Cavitand Derivatives. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 10764. <https://doi.org/10.3390/ijms221910764>

Academic Editors: Seung-Hong Lee and Ginnae Ahn

Received: 8 September 2021

Accepted: 2 October 2021

Published: 5 October 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Cancer is among the leading causes of death worldwide. Before the 1940s, only surgical therapy existed to treat cancer. It was demonstrated for the first time in 1942 that chemotherapy can induce tumor regression [1]. In the late 1940s, it was found that antimetabolites that inhibit the function of folate-requiring enzymes can induce remission in children with acute lymphoblastic leukaemia. These antimetabolites are the inhibitors of the enzyme dihydrofolate reductase (DHFR) and cause decreasing thymidylate synthesis which ultimately inhibits DNA synthesis [1].

Methotrexate (4-amino-10-methylfolic acid, MTX, Figure 1) is the most important antimetabolite chemotherapeutic agent, it is primarily used in acute lymphoblastic leukaemia, in certain lymphomas, osteosarcoma and choriocarcinoma [1]. In the 1980s, it was discovered that, at low doses, MTX has “steroid-like” anti-inflammatory and immunosuppressant effects and, in 1985, it was clinically demonstrated to be a potent and effective treatment in psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis, so, nowadays, it is a first line drug for these autoimmune diseases [2].

However, MTX and other chemotherapeutic agents can cause several adverse effects, because they affect every fast dividing cell of the body. Some toxicities are unrelated to folate antagonism and cannot be prevented by folate supplementation. These include nodulosis, hepatic fibrosis, pulmonary fibrosis, lethargy, fatigue, and renal insufficiency [3]. Association has been found between MTX use and increased risk for melanoma, lung cancer and non-Hodgkin lymphoma [4].

Alternative strategies to overcome low therapeutic indices, nonspecific targeting, and the off target toxicity of chemotherapeutics have emerged over the last years [5,6]. One

interesting and recent research field is photopharmacology. The principle of photopharmacology is the introduction of a photoswitchable unit into the molecular structure of a bioactive compound itself [7]. One major advantage of photopharmacological agents is that their activation is reversible, which may lead to a significant reduction in adverse drug reactions [8]. In general, this strategy uses molecules that can be efficiently excited to the more active form and spontaneously reisomerize to the less active isomer. The biological functions of photopharmacological molecules can be controlled with synthetic photoswitches. Photoswitches are chromophores that can be reversibly isomerized when exposed to light. Azobenzene is the most widely used photoswitch in biological applications because of the ease of synthesis and functionalization, fast photoisomerization, and low rate of photobleaching [9,10].

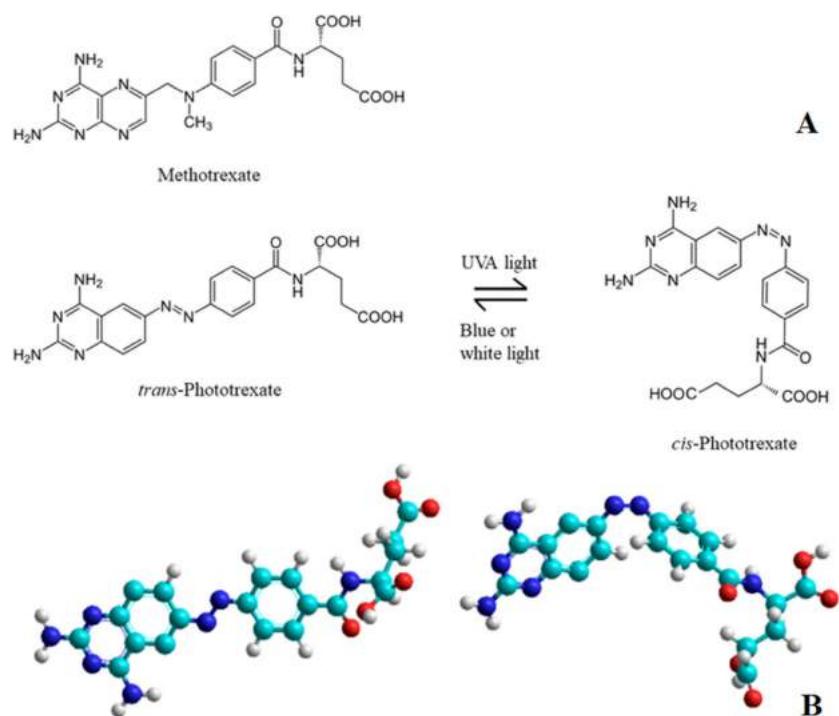


Figure 1. (A) Chemical structures of Methotrexate (MTX), *trans*-Phototrexate (*trans*-PHX) and *cis*-Phototrexate (*cis*-PHX) and the reversible isomerization of PHX [11]. (B) The 3D structure of the two isomers of the PHX: *trans*-PHX (left) and *cis*-PHX (right).

Phototrexate (PHX, Figure 1) is a photoswitchable azobenzene analogue of MTX that has been synthesized and described by Matera et al. [11] and by Mashita et al. [12]. PHX contains a diazene stereogenic unit and its pharmacological activity is higher in its *cis* state than in the thermodynamically more stable *trans* state. It can be effectively isomerized from *trans* to *cis* with UVA light and isomerized back from *cis* to *trans* with blue or white light (Figure 1). This transition is reversible and can be repeated several times. The antineoplastic effect (and, also, the adverse effects caused by the cytotoxic activity) appears only in light exposed regions and decreases in dark regions [11]. Target tissues might be those that can be exposed to UV illumination, primarily the skin, the digestive, respiratory and reproductive tracts.

Calixarenes are cyclic oligomer molecules that consist of phenolic units that are condensated in the presence of an aldehyde and linked to each other, typically through a methylene bridge, in an acidic environment [13,14]. They are widely used as host molecules in supramolecular chemistry, separation science and catalysis. They also have pharmaceutical applications as host molecules [14]. Substituents appended to the phenolic rings (upper or lower rim) can greatly influence the physical and chemical properties of

these molecules, but numerous derivatives have been synthesized that have functional groups on the periphery of the molecule, too [15]. Promising results have been described in the literature about calixarenes that have heterocyclic substituents on the periphery, they can be used as selective extractants for amino acids [16], chiral recognition agents [17] or chelators that trap metals [18]. Calix[4]arene-based P-ligands were used in rhodium-catalyzed hydroformylation [19]. Inserting additional methylene bridges between the phenolic oxygen atoms on adjacent aromatic rings, the structure is called a cavitand.

No study has been found in the literature that describes the host–guest complex formation or any weak molecular interaction of PHX, so cavitand–PHX interactions are an entirely unrevealed research field. Therefore, in this work, the thermodynamic parameters of the interaction of PHX with tetrakis(androst-4-en-3-one-17 α -ethynyl)-cavitand (TAC) and tetrakis(3,5-dicarboxylatophenoxy)-cavitand (TDC) (Figure 2) were studied. TAC was synthesized as previously described [20]. The synthesis of TDC is based on the Williamson-type ether synthesis, reacting tetrabromo-cavitand [21,22] with dimethyl 5-hydroxyisophthalate, followed by the hydrolysis of the ester functionalities. Fluorimetric measurements were applied to determine the thermodynamic parameters of the PHX–cavitand complex formation reaction.

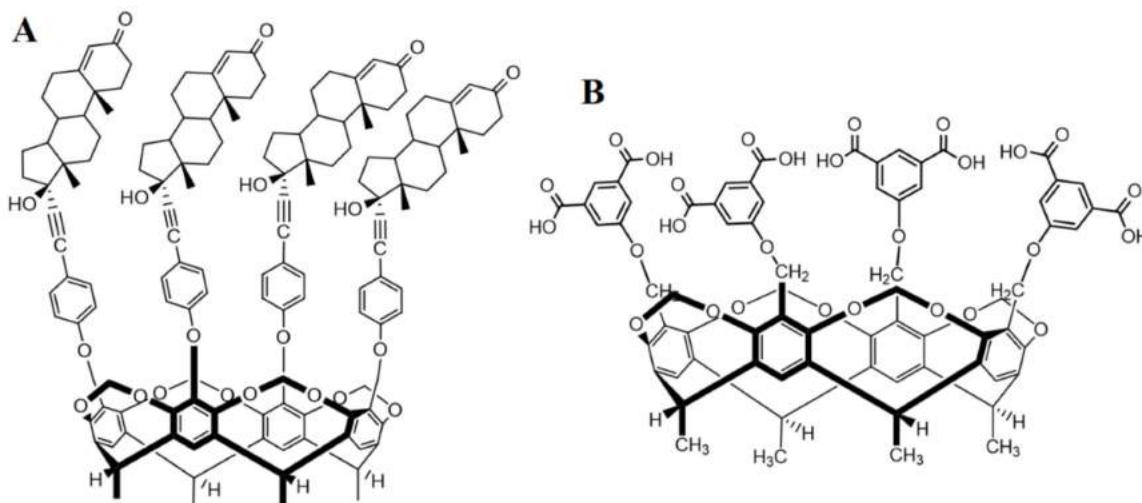


Figure 2. Chemical structures of the macrocyclic host molecules TAC (A) and TDC (B) (8-H, 9-H and 13-H of the steroidal skeleton are omitted for clarity).

2. Results

2.1. Determination of the Association Constants

To investigate the interaction of *cis*-PHX with the cavitand derivatives (TAC and TDC), the complete isomerization of the thermodynamically more stable *trans*-PHX has to be reached. To this purpose, UV light exposure ($\lambda = 366$ nm) was used, as in our previous work [23].

The absorption spectra of the isomers of PHX and the cavitand derivatives were registered (Figure 3). The absorption maxima of *cis*- and *trans*-PHX were at around 370 nm, while TDC and TAC showed significantly lower absorption values at this wavelength. Accordingly, applying a 366 nm excitation wavelength, the emission spectra of PHX were recorded.

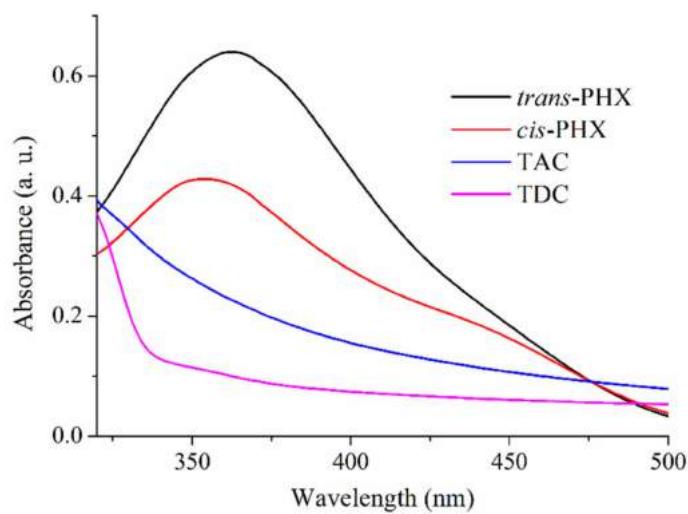


Figure 3. Absorption spectra of *trans*-PHX, *cis*-PHX, TAC and TDC at 50 μ M concentration.

The fluorescence spectra of *cis*- and *trans*-PHX show increased emission upon increased concentration of TAC or TDC (Figure 4). The changes induced in the spectra of PHX suggest interactions between the investigated molecules. Samples with different concentrations of the cavitand derivate (0–450 μ M) and with constant concentration of *trans*- and *cis*-PHX (50 μ M) were prepared and measured using a 366 nm excitation wavelength at 293 K, 298 K, 303 K and 308 K temperatures.

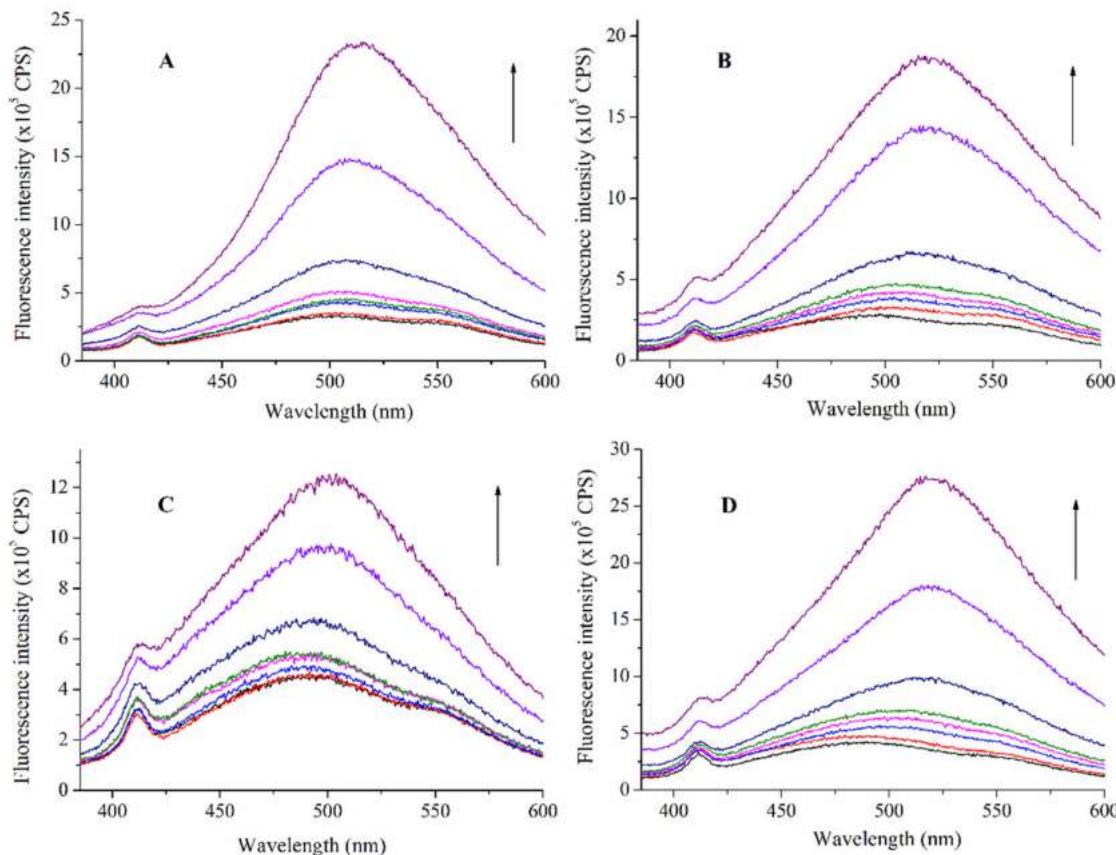


Figure 4. Fluorescence emission spectra of *trans*-PHX (A,B) and *cis*-PHX (C,D) (50 μ M) in the absence and presence of TAC (A,C) and TDC (B,D) (0–450 μ M) ($\lambda_{\text{exc}} = 366$ nm). The figure depicts the measurements that were carried out at 293 K. Arrows indicate increasing cavitand concentrations. Colors only support the clarity.

The stability constants of the *trans*-PHX-TAC, *trans*-PHX-TDC, *cis*-PHX-TAC and *cis*-PHX-TDC have been determined using the Benesi–Hildebrand method. To determine the thermodynamic parameters, the stability constants have been calculated at temperatures 293 K, 298 K, 303 K and 308 K. In all cases, the intensity values obtained at 490 nm have been used to evaluate the data. Table 1 summarizes the results. The determined stability constants were then used to calculate the thermodynamic parameters (ΔH , ΔS , and ΔG) of the interactions (Table 2).

Table 1. Stability constants of the investigated interactions determined at different temperatures.

Temperature (K)	<i>trans</i> -PHX-TAC	<i>trans</i> -PHX-TDC	<i>cis</i> -PHX-TAC	<i>cis</i> -PHX-TDC
293	3.55 ± 0.19	3.05 ± 0.15	2.07 ± 0.17	3.08 ± 0.25
298	3.62 ± 0.21	2.95 ± 0.19	2.40 ± 0.21	3.03 ± 0.21
303	3.89 ± 0.18	2.88 ± 0.17	2.78 ± 0.22	2.90 ± 0.22
308	4.01 ± 0.20	2.73 ± 0.16	3.01 ± 0.20	2.88 ± 0.18

Table 2. Thermodynamic parameters of the complex formation between the cavitands and the isomers of PHX. ΔG values have been determined for 298 K.

	$\Delta H (\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	$\Delta S (\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1})$	$\Delta G (\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$
<i>trans</i> -PHX-TAC	57.30 ± 2.84	262.97 ± 11.36	-21.10 ± 4.03
<i>trans</i> -PHX-TDC	-35.97 ± 3.69	-64.10 ± 10.43	-16.85 ± 3.21
<i>cis</i> -PHX-TAC	109.65 ± 6.93	414.12 ± 17.51	-13.83 ± 3.35
<i>cis</i> -PHX-TDC	-24.88 ± 3.20	-25.94 ± 4.72	-17.15 ± 3.62

The Van 't Hoff plots of the investigated interactions have been created by plotting the logarithms of the stability constants against the reciprocal temperatures (Figure 5). It can be observed that the thermodynamic parameters of the complex formation of the two cavitand derivates differ significantly.

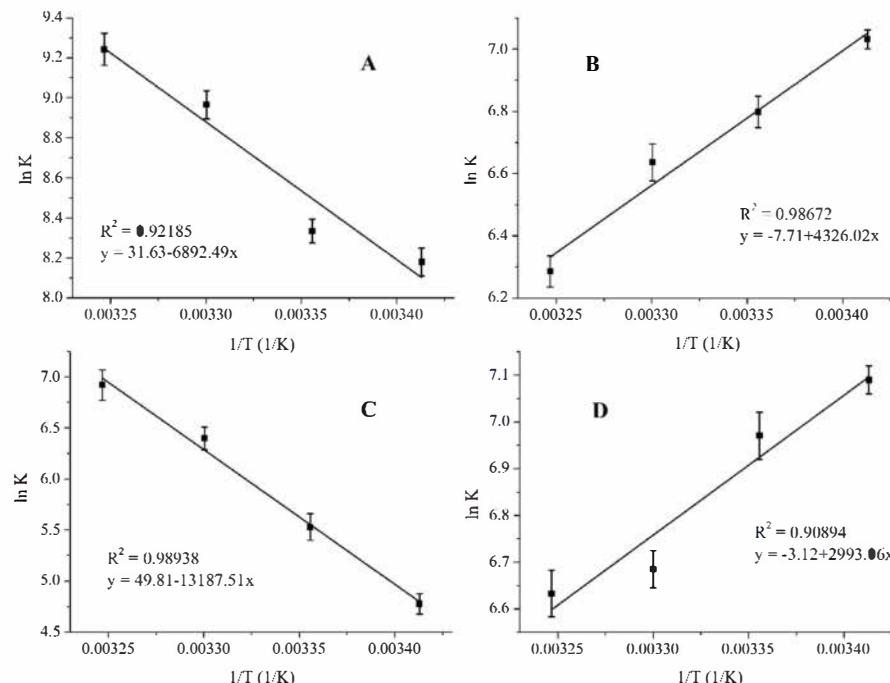


Figure 5. Van 't Hoff plots of the complex formation of *trans*-PHX and TAC (A), *trans*-PHX and TDC (B), *cis*-PHX and TAC (C) and *cis*-PHX and TDC (D).

These results imply different complex formation mechanisms for the different cavitand derivatives (TAC and TDC). In the presence of TAC, entropy gain is associated with enthalpy gain, while in the samples containing TDC, entropy loss is associated with enthalpy loss.

2.2. Modelling Studies

The calculations, performed to determine the thermodynamic parameters associated with the complex formation of PHX with TAC and TDC molecules, used the explicit solvent model, therefore, motions of solvent molecules were also considered. Table 3 summarizes these results and Figure 6 represents the conformations of the most stable complexes. The agreement of the calculated thermodynamic values and the results of the experiments support the appropriateness of the applied model. Considering the conformations and the accurately determined translation–rotation–vibration terms of the entropy, the translational entropy of the solvent molecules is found to be up to 85 percent responsible for the total entropy gain during formation of PHX–TAC complexes. The contribution of the translational entropy remains high in the case of the formation of PHX–TDC complexes; the decreased vibrational entropy of the dicarboxylatophenoxy moieties reduces the entropy gain.

Table 3. Thermodynamic parameters of the complex formation between the cavitands and the isomers of PHX determined at AM1 level applying the TIP3P solvation model. ΔG values have been calculated for 298 K.

	$\Delta H\text{ (kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\text{)}$	$\Delta S\text{ (J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}\text{)}$	$\Delta G\text{ (kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\text{)}$
<i>trans</i> -PHX-TAC	42.13	210.99	−20.89
<i>trans</i> -PHX-TDC	−33.63	−58.13	−16.29
<i>cis</i> -PHX-TAC	101.11	392.09	−15.79
<i>cis</i> -PHX-TDC	−23.54	−22.93	−16.70

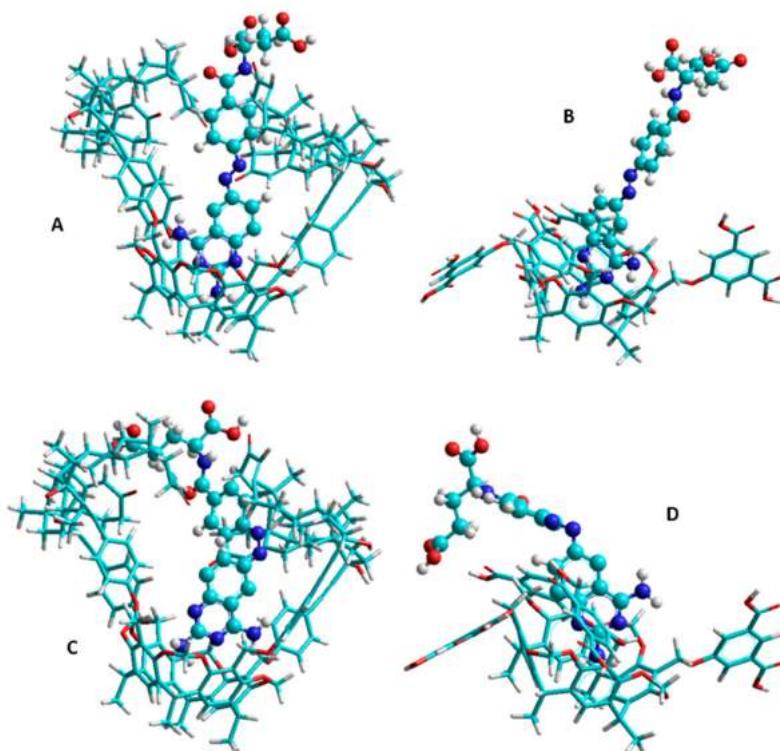


Figure 6. The 3D structures of the complexes of *trans*-PHX with TAC (**A**), *trans*-PHX with TDC (**B**), *cis*-PHX with TAC (**C**) and *cis*-PHX with TDC (**D**) calculated at AM1 level using the TIP3P solvation model. Solvent molecules are omitted due to the clarity.

3. Discussion

The thermodynamics of the interaction of TAC and TDC molecules with the two isomers of PHX confirm the formation of stable host–guest complexes within the temperature range between 293 K and 308 K in a dimethyl sulfoxide medium. However, the enthalpy and entropy changes associated with the molecular interaction of PHX with TAC and TDC suggest entirely different mechanisms at molecular level. Modelling studies draw attention to the importance of the reorganization and destruction of the solvation shell upon the molecular association, and of the structural properties of the host molecules as well. Accordingly, both the TAC and TDC molecules possess two rims, which are potentially able to bind to the guest molecules: the core skeleton of the cavitands can include guests of an appropriate size, and the functionalized upper rims can also be bound to the guests. In the case of TAC, the large androst-4-en-3-one- 17α -ethinyl functions block the entrance of the cavitand cavity prior the interaction with the PHX. This property causes the energy cost of the opening procedure during the interaction, and it results in the positive enthalpy change. As a parallel effect, the removal of the solvent molecules from the solvation shell of the steroidal moieties also costs energy, thereby further increasing the enthalpy change, while the increased freedom of the guest molecules after the leaving of the solvation shell causes the large entropy gain and results in the positive entropy changes of the association process. Modelling studies highlight that about 85 percent of the entropy gain originated from the increased translational freedom of the solvent molecules. This property is more pronounced in the case of *cis*-PHX–TAC complexes. The positive enthalpy and entropy changes, finally, support the formation of stable PHX–TAC complexes, but, considering that the temperature dependence is determined by the enthalpy changes, the stability of the complexes with TAC host increases at higher temperature. In contrast, the interactions of the *cis*- and *trans*-PHX with the TDC molecules are associated with negative enthalpy and entropy changes. This is probably due to the smaller reorganization energies of the 1,3-dicarboxylato-5-phenoxy moieties located at the upper rim of the TDC molecule and also due to the fact that the destruction of the smaller sized solvation shell of the 1,3-dicarboxylato-5-phenoxy arms result less free dimethyl sulfoxide molecules upon the interaction with the PHX guests. It is to be mentioned here, that in this case the increased translational entropy of the solvent molecules cannot overcompensate the reduced entropy of the aforementioned dicarboxylatophenoxy moieties, which is originated from the reduced vibrational freedom of these arms upon complex formation.

Considering the two significantly different complex formation procedures, we can conclude that the opposite temperature dependence of the complex stabilities associated to the formation of PHX-TAC and PHX-TDC complexes is originated from the different functional groups located at the upper rim of the host molecules. Furthermore, the fact that the increased freedom of the solvent molecules can be determinant in the association process is also because dimethylsulfoxide, as a nonprotic solvent, does not form clusters after leaving the solvation shell. Therefore, there is no such process that could decrease the entropy gain.

4. Materials and Methods

4.1. Synthesis of Tetrakis(3,5-dicarboxylatophenoxy)-cavitand (TDC, 3)

Dimethyl 5-hydroxyisophthalate (2.10 g, 10 mmol) and K_2CO_3 (2.07 g, 15 mmol) were dissolved in 50 mL of DMSO in a 100 mL round bottom flask under argon. The mixture was equipped with a magnetic stirrer and stirred for one hour at room temperature. Subsequently, Tetrabromocavitand 1 [22,23] (964.3 mg, 1.0 mmol) was added to the reaction mixture, the flask was stirred at 80 °C for 18 h under argon atmosphere. The mixture was cooled to room temperature and poured into 250 mL of 2% hydrochloric acid. The precipitate was filtered through a glass filter and washed with ice cold water and small portion of n-hexane, and dried under vacuum at 80 °C. Yield: 1.28 g/84%. The resulting product (Cavitand 2) was immediately transferred into the following ester hydrolysis (Figure 7).

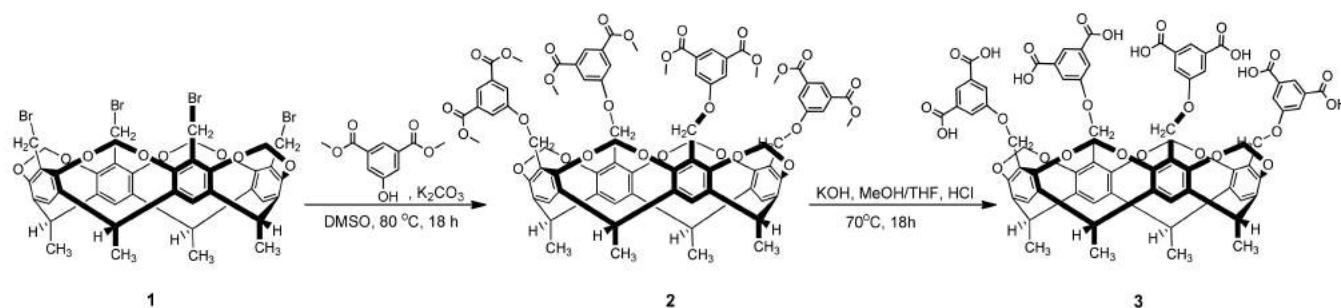


Figure 7. Schematic synthesis of TDC (3).

Cavitand **2** (764.8 mg, 0.5 mmol) was dissolved in 20 mL of THF in a 100 mL round bottom flask, then 3 mL of Claisen's alkali (prepared by dissolving 350 g of KOH in 250 cm³ of water, cooling and diluting to 1 L with MeOH) was added to the reaction mixture. The reaction mixture was refluxed at 70 °C for 18 h. The mixture was cooled to room temperature and the solution was acidified with 2 M hydrochloric acid. The precipitate was filtered through a glass filter and washed with ice cold water and small portion of n-hexane, and dried under vacuum at 80 °C. White powder (623.6 mg, 88%) was obtained (TDC, **3**). Melting point: >260 °C, δH (500.1 MHz, DMSO-d6): 1.89 (d, *J* = 7.4 Hz, 12H, CH₃CH), 4.48 (d, *J* = 7.6 Hz, 4H, inner OCH₂O), 4.85–4.94 (m, 12H, ArCH₂O overlapping signals with CH₃CH), 5.92 (d, *J* = 7.6 Hz, 4H, outer OCH₂O), 7.03 (t, *J* = 7.5 Hz, 4H, Ar-H), 7.28 (dd, *J* = 7.6 Hz, 1.4 Hz, 4H, Ar-H), 7.49 (t, *J* = 7.5 Hz, 4H, Ar-H), 7.59 (dd, *J* = 7.6 Hz, 1.4 Hz, 4H, Ar-H), 7.89 (s, 4H, Ar-H), 10.62 (brs, 4H, COOH), 12.51 (brs, 4H, COOH), δC (125.1 MHz, DMSO-d6): 16.4, 30.6, 61.4, 100.0, 119.8, 122.7, 123.0, 125.4, 133.1, 139.6, 153.7, 159.1, 167.3.

4.2. Synthesis of PHX

Trans-Phototrexate (*trans*-PHX) was synthesized in our institute. During the synthesis, we followed the procedure of Matera et al. [11], as shown in Figure 8. Briefly, **4** quinazoline-2,4,6-triamine was conjugated to **5** (S)-diethyl 2-(4-nitrosobenzamido)-pentanedioate to offer compound **6**. The latter was hydrolysed in mixture of sodium hydroxide and ethanol to yield PHX.

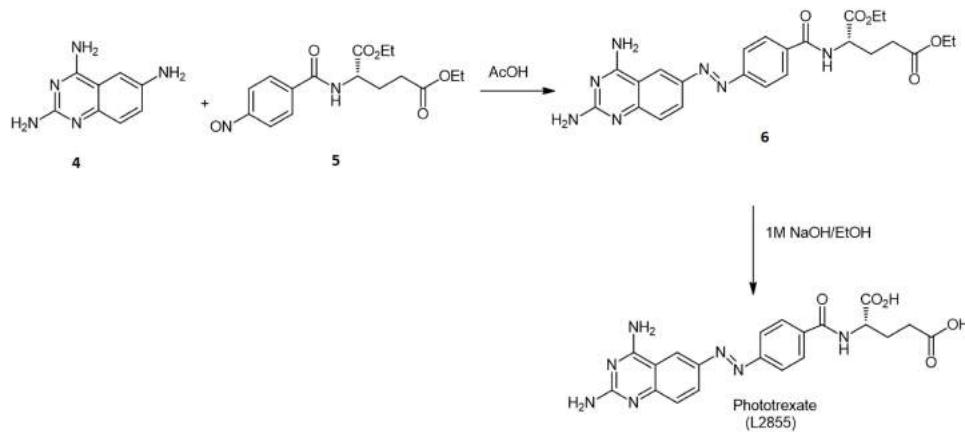


Figure 8. Schematic synthesis of PHX.

After chromatographic purification, the physicochemical data of PHX was in agreement with that of earlier published data. HRMS (ESI): m/z [M+H]⁺ calculated for C₃₀H₃₀N₇O₅⁺: 438.1520; found: 438.1520 (Figure 9).

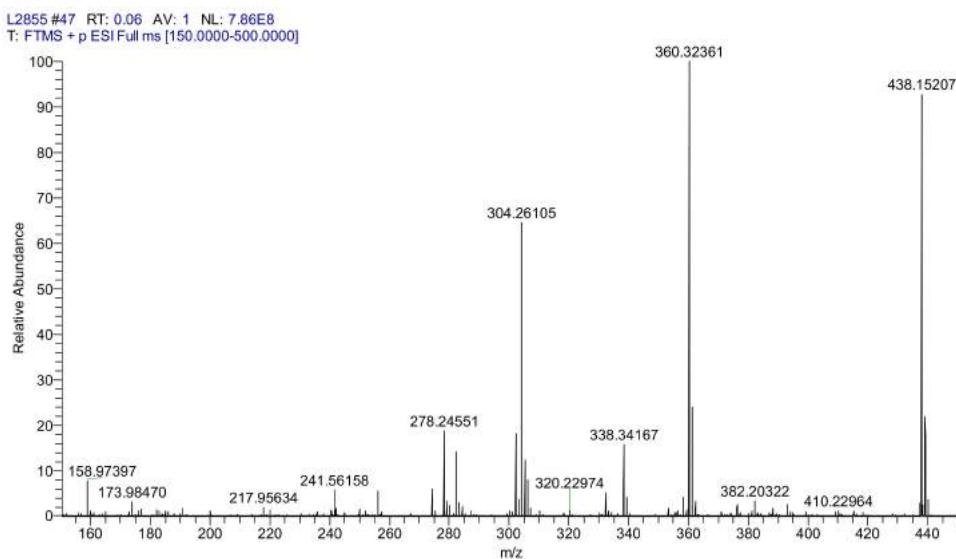


Figure 9. HRMS spectrum of PHX.

4.3. Other Chemicals and Instruments

The applied solvent was dimethyl sulfoxide (DMSO) purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

Fluorimetric measurements were performed with a Fluorolog τ3 spectrofluorometer (Jobin-Yvon/SPEX, Longjumeau, France). Fluorescence spectra were recorded using 366 nm excitation wavelength. The emission values obtained at 490 nm were used for data evaluation. For data collection, photon counting method with 0.1 s integration time was used and 2 nm bandwidths set and quartz cuvettes with 1.0 cm thickness were applied.

The temperature dependence of binding constants was measured to determine the thermodynamic parameters associated to the binding of *trans*-PHX and *cis*-PHX to the cavitand derivatives (TAC and TDC). Accordingly, samples with different concentrations of the cavitand derivatives (0–450 μM), and with constant concentration of *trans*- and *cis*-PHX (50 μM), were prepared and measured using 366 nm excitation wavelength at 293 K, 298 K, 303 K and 308 K temperatures.

The thermodynamically stable but pharmacologically inactive *trans*-PHX was isomerized with the application of UV-light ($\lambda = 366$ nm) provided by a Fluotest lamp (Original Hanau, Hanau, Germany). To ensure the complete isomerization, UV-vis spectra were recorded by a Specord Plus 210 spectrophotometer (Analytik Jena, Jena, Germany).

4.4. Data Evaluation

Stability constants (K , dm^3/mol) of PHX–cavatand complexes were calculated either using the Benesi–Hildebrand equation, assuming 1:1 complex stoichiometry:

$$\frac{I_0}{I - I_0} = \frac{1}{A} + \frac{1}{A \cdot K \cdot [C]} \quad (1)$$

where I_0 and I are the fluorescence emission intensities of PHX in the absence and in the presence of the host, respectively; $[C]$ is the molar concentration of the host molecule while A is a constant.

To determine the thermodynamic parameters, temperature dependence of the complex stabilities was examined, then the thermodynamic parameters were calculated using the Van 't Hoff equation:

$$\ln K = -\frac{\Delta G}{R \cdot T} + \frac{\Delta S}{R} \quad (2)$$

where the ΔH and ΔS stand for the enthalpy and entropy changes of the complex formation, respectively, while ΔG is the Gibbs free energy change. R is the gas constant, while T is the temperature in Kelvin.

4.5. Modelling

Thermodynamic parameters of the Phototrexate–cavatand complexes were determined as follows. The enthalpy change was considered as the energy change calculated by subtracting the total energies of the reactants from the total energies of the products. Similarly, the entropy changes were calculated by subtracting the entropy terms of the reactants from the entropy terms of the products. Calculation of the entropy term was implemented in the HyperChem code as follows: after calculating the vibrational frequencies using the harmonic approximation, the entropy was then determined by the following equation:

$$S_{vib} = R \sum_i \left\{ \frac{\hbar\nu_i/kT}{e^{(\hbar\nu_i/kT)} - 1} - \ln[1 - e^{(-\hbar\nu_i/kT)}] \right\} \quad (3)$$

Here, ν_i is the frequency of vibration and T is the temperature.

The molecular environment was considered by the TIP3P method while the simulation box randomly filled by the dimethyl sulfoxide molecules. The total energies of the species interacted have been calculated at semi-empirical AM1 level using HyperChem 8 code.

5. Conclusions

In this study, the complex formation thermodynamics of *trans*-PHX and *cis*-PHX was investigated with the host molecules TAC and TDC, both of which are cavatand derivatives. The applied methods were fluorescence spectroscopy and 3D modelling. Opposite temperature dependence of the stability of PHX-TAC and PHX-TDC complexes was found. These results imply different complex formation mechanisms.

The host–guest complex formation of PHX was described for the first time. PHX is a promising new molecule whose cytotoxic effect can be regulated with light. Complex formation can be another method that could make the physiological effect of this molecule more adjustable.

Author Contributions: Conceptualization, Z.P. and S.K.-M.; methodology, Z.P., Z.N., L.K., T.K. and S.K.-M.; formal analysis, Z.P.; investigation, Z.P.; resources, L.K., T.K. and S.K.-M.; data curation, Z.P.; writing—original draft preparation, Z.P. and S.K.-M.; writing—review and editing Z.P., L.K., T.K. and S.K.-M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Hungarian National Research Development and Innovation Office (NKFI) NKFI-137793, 2019-2.1.11-TÉT-2019-00042, and by the European Union, co-financed by the European Social Fund EFOP-3.6.1.-16-2016-00004. New National Excellence Program of the Ministry for Innovation and Technology. Project no. TKP2020-IKA-08 has been implemented with the support provided from the NKFI, financed under the 2020-4.1.1-TKP2020 funding scheme.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: The authors thank to József Jekő (University of Nyíregyháza, Hungary) for mass spectral measurements.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Chabner, B.A.; Roberts, T.G. Chemotherapy and the war on cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 65–72. [CrossRef] [PubMed]
- Shams, S.; Martinez, J.M.; Dawson, J.R.D.; Flores, J.; Gabriel, M.; Garcia, G.; Guevara, A.; Murray, K.; Pacifici, N.; Vargas, M.V.; et al. The Therapeutic Landscape of Rheumatoid Arthritis: Current State and Future Directions. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, 1233. [CrossRef] [PubMed]
- Tian, H.; Cronstein, B.N. Understanding the mechanisms of action of methotrexate. *Bull. NYU Hosp. Jt. Dis.* **2007**, *65*, 168–173. Available online: http://metoject.ru/wp-content/uploads/files/public_en/34.pdf (accessed on 3 October 2021). [PubMed]
- Solomon, D.H.; Kremer, J.M.; Fisher, M.; Curtis, J.R.; Furer, V.; Harrold, L.R.; Hochberg, M.C.; Reed, G.; Tsao, P.; Greenberg, J.D. Comparative cancer risk associated with methotrexate, other non-biologic and biologic disease-modifying anti-rheumatic drugs. *Semin. Arthritis Rheu.* **2014**, *43*, 489–497. [CrossRef] [PubMed]
- Senapati, S.; Mahanta, A.K.; Kumar, S.; Maiti, P. Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2018**, *3*, 7. [CrossRef]
- Baudino, T.A. Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. *Curr. Drug Discov. Technol.* **2015**, *12*, 3–20. [CrossRef]
- Broichhagen, J.; Frank, J.A.; Trauner, D. A Roadmap to Success in Photopharmacology. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 1947–1960. [CrossRef]
- Reessing, F.; Szymanski, W. Beyond Photodynamic Therapy: Light-Activated Cancer Chemotherapy. *Curr. Med. Chem.* **2017**, *24*, 4905–4950. [CrossRef] [PubMed]
- Szymanski, W.; Beierle, J.M.; Kistemaker, H.A.; Velema, W.A.; Feringa, B.L. Reversible photocontrol of biological systems by the incorporation of molecular photoswitches. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 6114–6178. [CrossRef]
- Banghart, M.R.; Mourot, A.; Fortin, D.L.; Yao, J.Z.; Kramer, R.H.; Trauner, D. Photochromic blockers of voltage-gated potassium channels. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9097–9101. [CrossRef]
- Matera, C.; Gomila, A.M.J.; Camarero, N.; Libergoli, M.; Soler, C.; Gorostiza, P. Photoswitchable Antimetabolite for Targeted Photoactivated Chemotherapy. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 15764–15773. [CrossRef] [PubMed]
- Mashita, T.; Kowada, T.; Takahashi, H.; Matsui, T.; Mizukami, S. Light-wavelength based Quantitative Control of Dihydrofolate Reductase Activity Using Photochromic Isostere of Inhibitor. *ChemBioChem* **2019**, *20*, 1382–1386. [CrossRef] [PubMed]
- Fahmy, S.A.; Brüßler, J.; Alawak, M.; El-Sayed, M.M.H.; Bakowsky, U.; Shoeib, T. Chemotherapy Based on Supramolecular Chemistry: A Promising Strategy in Cancer Therapy. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 292. [CrossRef] [PubMed]
- Hoskins, C.; Curtis, A.D.M. Simple Calix[n]arenes and Calix[4]resorcinarenes as Drug Solubilizing Agents. *J. Nanomed. Res.* **2015**, *2*, 00028. [CrossRef]
- Neda, I.; Vollbrecht, A.; Grunenberg, J.; Schmutzler, R. Functionalization of the Periphery of Calix[4]resorcinarenes with P(III)-containing Substituents via Hydroxy-, Trimethylsiloxy- and Ethoxy-Tethered Trimethylsiloxy Intermediates. *Heteroat. Chem.* **1998**, *9*, 553–558. [CrossRef]
- Franz, M.H.; Iorga, M.; Maftei, C.V.; Maftei, E.; Neda, I. Studies on the constituents of Helleborus purpurascens: Use of derivatives from calix[6]arene, homooxa-calix[3]arene and homoazacalix[3]arene as extractant agents for amino acids from the aqueous extract. *Amino Acids* **2020**, *52*, 55–72. [CrossRef]
- Maftei, V.; Fodor, E.; Jones, P.G.; Franz, M.H.; Davidescu, C.M.; Neda, I. Asymmetric Calixarene Derivatives as Potential Hosts in Chiral Recognition Processes. *Pure Appl. Chem.* **2015**, *87*, 415–439. [CrossRef]
- Dieleman, B.; Matt, D.; Neda, I.; Schmutzler, R.; Harriman, A.; Yaftian, R. Hexahomotrioxacalix[3]arene: A scaffold for a C3-symmetric phosphine ligand that traps a hydro-rhodium fragment inside a molecular funnel. *Chem. Commun.* **1999**, 1911–1912. [CrossRef]
- Kunze, C.; Selent, D.; Neda, I.; Schmuzler, R.; Spannenberg, A.; Börner, A. Synthesis of New Calix[4]arene-Based Phosphorus Ligands and Their Application in the Rh(I) Catalyzed Hydroformylation of 1-Octene. *Heteroat. Chem.* **2001**, *12*, 577–585. [CrossRef]
- Preisz, Z.; Nagymihály, Z.; Lemli, B.; Kollár, L.; Kunsági-Máté, S. Weak interaction of the antimetabolite drug methotrexate with a cavitand derivative. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 4345. [CrossRef]
- Csók, Z.; Kégl, T.; Párkányi, L.; Varga, Á.; Kunsági-Máté, S.; Kollár, L. Facile, high yielding synthesis of deepened cavitands: A synthetic and theoretical study. *Supramol. Chem.* **2011**, *23*, 710–719. [CrossRef]
- Sorrell, T.N.; Pigge, F.C. A convenient synthesis of functionalized cavitands via free-radical bromination. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 784–785. [CrossRef]
- Preisz, Z.; Hartvig, N.; Bognár, B.; Kálai, T.; Kunsági-Máté, S. Comparative EPR Study on the Scavenging Effect of Methotrexate with the Isomers of Its Photoswitchable Derivative. *Pharmaceutics* **2021**, *14*, 665. [CrossRef] [PubMed]



Article

Weak Interaction of the Antimetabolite Drug Methotrexate with a Cavitand Derivative

Zsolt Preisz ^{1,2}, Zoltán Nagymihály ^{3,4}, Beáta Lemli ^{1,4} , László Kollár ^{3,4} and Sándor Kunsági-Máté ^{1,2,4,*}

¹ Institute of Organic and Medicinal Chemistry, Medical School, University of Pécs, Szigeti 12, H-7624 Pécs, Hungary; preisz.zsolt@pte.hu (Z.P.); beata.lemli@aok.pte.hu (B.L.)

² Department of General and Physical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Pécs, Ifjúság 6, H 7624 Pécs, Hungary

³ Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Sciences, University of Pécs, Ifjúság 6, H 7624 Pécs, Hungary; nmzoltan@gamma.ttk.pte.hu (Z.N.); kollar@gamma.ttk.pte.hu (L.K.)

⁴ János Szentágothai Research Center, University of Pécs, Ifjúság 20, H-7624 Pécs, Hungary

* Correspondence: sandor.kunsagi-mate@aok.pte.hu; Tel.: +36-72-503600 (ext. 35449)

Received: 2 June 2020; Accepted: 16 June 2020; Published: 18 June 2020



Abstract: Formation of inclusion complexes involving a cavitand derivative (as host) and an antimetabolite drug, methotrexate (as guest) was investigated by photoluminescence measurements in dimethyl sulfoxide solvent. Molecular modeling performed in gas phase reflects that, due to the structural reasons, the cavitand can include the methotrexate in two forms: either by its opened structure with free androsta-4-en-3-one-17 α -ethinyl arms or by the closed form when all the androsta-4-en-3-one-17 α -ethinyl arms play role in the complex formation. Experiments reflect enthalpy driven complex formation in higher temperature range while at lower temperature the complexes are stabilized by the entropy gain.

Keywords: methotrexate; antirheumatic; cavitand; inclusion complex; thermodynamics; fluorescence

1. Introduction

Methotrexate (4-{N-[{(2,4-diaminopteridin-6-yl) methyl]-N-methylamino} benzoyl}-L-glutamic acid, MTX, Figure 1) is an antimetabolite drug. It is widely used as a chemotherapeutic agent in rheumatoid arthritis (RA), psoriasis and some sorts of leukemia. MTX is a relatively well-known molecule and is a first-line antirheumatic medication because of its efficacy and safety [1]. It decreases the concentration of tetrahydrofolate (THF) in the cells by the inhibition of dihydrofolate reductase (DHFR) enzyme, therefore it reduces the purine nucleotide and DNA synthesis [2]. Other mechanisms of action were also mentioned in the literature, including reduction of antigen-dependent T-cell proliferation, promotion of adenosine release and suppression of transmethylation reaction [3,4].

Calixarenes are cyclic oligomers that consist of phenolic units that are condensated in the presence of an aldehyde and linked to each other, typically through a methylene bridge, in an acidic environment [5,6]. They are widely used in supramolecular chemistry, separation science and catalysis. They also have pharmaceutical applications as host molecules [6]. Substituents appended to the phenolic rings (upper or lower rim) can greatly influence the physical and chemical properties of these molecules, but numerous derivatives have been synthesized that have functional groups on the periphery of the molecule, too [7]. Promising results have been described in the literature about calixarenes that have heterocyclic substituents on the periphery, they can be used as selective extractants for amino acids [8], chiral recognition agents [9] or chelators that trap metals [10]. Calix[4] arene-based P-ligands were used in rhodium-catalyzed hydroformylation [11].

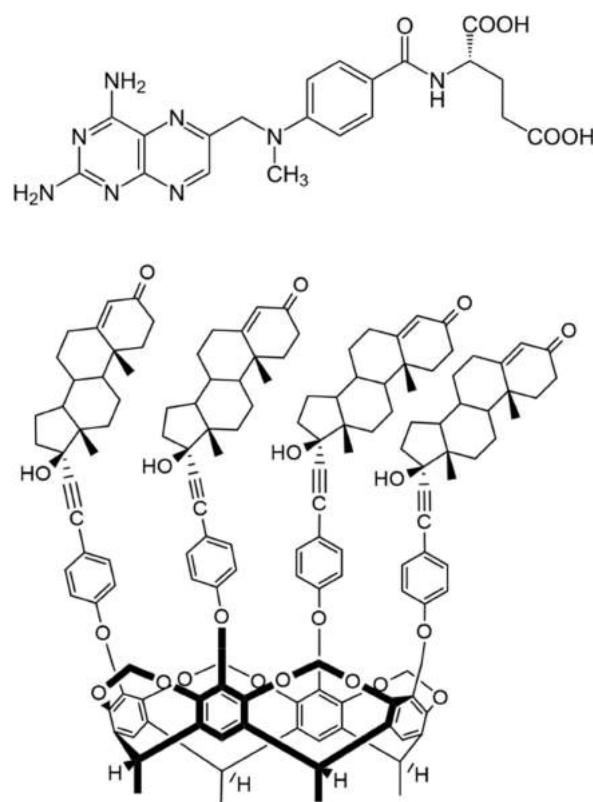


Figure 1. Chemical structure of antirheumatic and antitumor drug methotrexate (MTX, top) and the macrocyclic host molecule tetrakis(androst-4-en-3-one-17 α -ethinyl)-cavitand (TAC, bottom) (8β -H, 9α -H and 13α -H are omitted for clarity).

Inserting additional methylene bridges between the phenolic oxygen atoms on adjacent aromatic rings, the structure is called a cavitand.

There is a wide range of literature available on the interactions between MTX and some macrocyclic compounds, e.g., cyclodextrins [12–14] and cucurbiturils [15], but just a limited number of researches were reported about the calixarene derivatives [16]. Moreover, no publication was found to describe the interaction of MTX with cavitands, despite that calixarenes and cavitands have some advantages compared with other host molecules, because they possess an aromatic cavity, which can embed MTX due to the π – π and CH– π interactions both inside and outside the cavity [16].

The MTX-cavitand interaction found to be an entirely unrevealed research field. Therefore, in this work the thermodynamic parameters of the interaction of MTX with tetrakis(androst-4-en-3-one-17- α -ethinyl)-cavitand (TAC) (Figure 1) were studied. This is a calix[4] resorcinarene derivative cavitand, in which ethisterone moieties are appended to the aromatic rings. Fluorimetric measurements were applied to determine the thermodynamic parameters of the MTX-cavitand complex formation reaction.

2. Results

2.1. Spectroscopic Determination of the Association Constants

Absorption spectra of MTX and TAC (Figure 2A) show absorption maximum of MTX at 390 nm, while no considerable emission of TAC can be obtained at this wavelength. Accordingly, applying 390 nm excitation wavelength, emission spectra of MTX were recorded. Fluorescence spectra of MTX show increased emission upon increased concentration of TAC (Figure 3.). The enhancement of the PL signal can be described by two processes: (i) the guest MTX molecules loose the solvation shell

reducing the quenching the PL signal induced by the solvent molecules, or, ii) the flexible MTX skeleton stabilized further by the TAC hosts and the reduced movements also support increasing the PL signal. Therefore, the changes induced in the spectra of MTX reflect interaction between the two molecules.

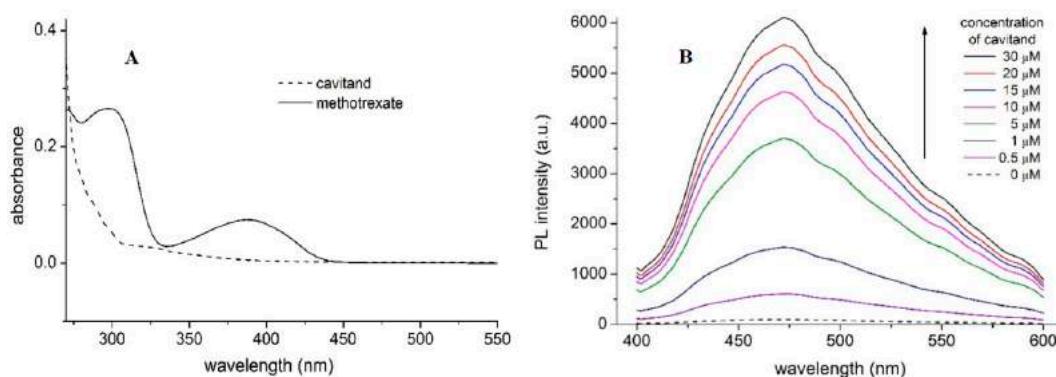


Figure 2. Absorption spectra of MTX (10 μM) and TAC (10 μM) (**A**) and fluorescence emission spectra of MTX (10 μM) in the absence and presence of TAC (0–30 μM) at 393.15 K (**B**). PL and a.u. reflect photoluminescence and arbitrary units, respectively.

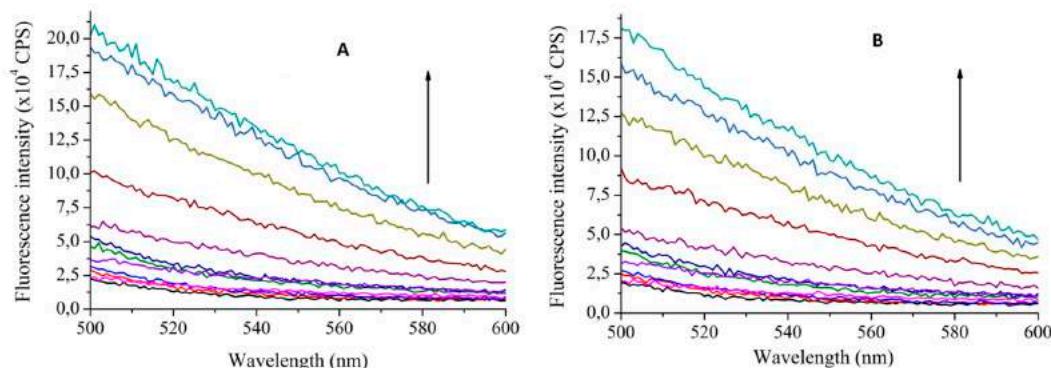


Figure 3. Fluorescence emission spectra of MTX (10 μM) in the absence and presence of TAC (0–80 μM) at 393.15 K (**A**) and at 313.15 K (**B**) ($\lambda_{\text{excitation}} = 390 \text{ nm}$). Arrows indicate increasing TAC concentrations (CPS reflects counts per s, colors only support the clarity).

The stability constants of this interaction can be calculated using the Benesi–Hildebrand method. To determine the thermodynamic parameters, the stability constants were calculated at temperatures 293.15 K, 296.48 K, 299.82 K, 303.15 K, 306.48 K, 309.82 K and 313.15 K. Considering that the DMSO solvent shows considerable Raman peaks overlapping the emission of MTX, two methods were applied to confirm the complex stabilities: either the HyperQuad code was applied using 10 selected wavelengths around the emission maxima (470–480 nm, see Figure 2.) or applying the Benesi–Hildebrand method, the right leg of the emission spectra is used, where the Raman scattering is negligible. In this case intensities obtained at 540 nm emission wavelength were applied to evaluate the data. Table 1 summarizes these results. These stability constants were then used to calculate the thermodynamic parameters of the interaction (Table 2).

2.2. Formation Thermodynamics

Two different temperature regions can be observed on the van 't Hoff plot (the logarithms of the stability constants were plotted against the reciprocal temperatures, Figure 4) of the interaction where the thermodynamic parameters of the complex formation differ significantly.

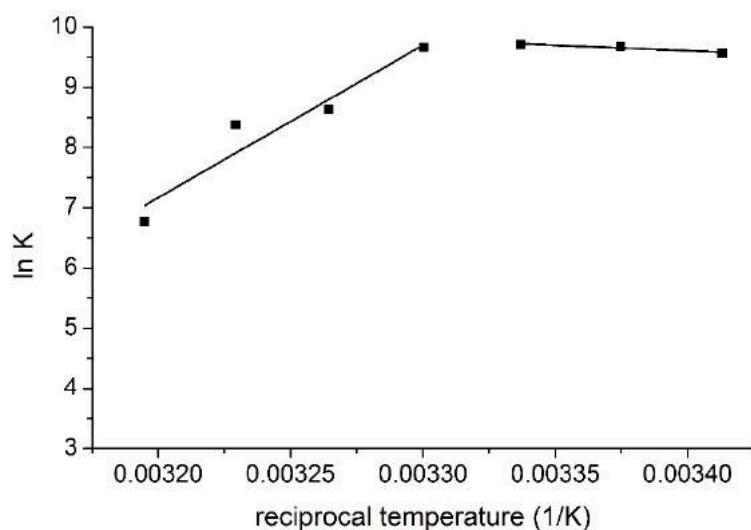
Table 1. Stability constants determined at different temperatures

Temperature (K)	log K (BH)	log K (HyperQuad)
293.15	4.16	4.13
296.48	4.20	4.18
299.82	4.22	4.20
303.15	4.19	4.20
306.48	3.75	3.72
309.82	3.64	3.61
313.15	2.94	2.92

BH reflects the Benesi-Hildebrand method.

Table 2. Thermodynamic parameters of the complex formation between TAC and MTX

Temperature (K)	Experiments		Structure (see Figure 5)	Modeling	
	ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔS (J K ⁻¹ mol ⁻¹)		ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔS (J K ⁻¹ mol ⁻¹)
293.15–299.82	15.79 ± 0.7	133.56 ± 6	closed	8.43	126.11
303.15–313.15	-210.66 ± 1.7	-614.57 ± 12	opened	-154.42	-214.67

 ΔH and ΔS are the enthalpy change and entropy change, respectively.**Figure 4.** van 't Hoff plot of the complex formation of MTX and TAC.

These results imply different complex formation mechanisms in the different temperature regions. At lower temperatures, entropy gain is associated with enthalpy gain, but at higher temperatures, entropy loss is associated with enthalpy loss. Based on these observations, it is suggested that in the lower temperature region MTX interacts with the ethisterone moieties of TAC, i.e., with the chiral inlet of the host molecule. In this way, the entropy gain is caused by the removal of solvent molecules, but this process costs energy, this is the reason of the moderated positive enthalpy change. However, in the higher temperature region MTX interacts with the rigid inner cavity of TAC, i.e., with the lower lying aromatic ‘basket’, which causes entropy loss associated with the decreased freedom of the cavitand skeleton during complex formation. The negative enthalpy change reflects attractive interactions between the MTX molecules and the ethisterone arms of the cavitand.

2.3. Modeling Studies

The total energies of the species interacted were calculated first at semi-empirical AM1 level using Hyper Chem 8 code. The host cavitand molecule shows two stable conformers according to the orientation of the large ethisterone moieties on the upper rim (see Figure 5): the opened structure associated with more flexible skeleton compared to the closed structure where the ethisterone moieties possess reduced freedom due to the steric hindering of their motion. The differences between the calculated total Gibbs free energies of the parent 'opened' or 'closed' molecules in gas phase (partition of solvent motions is excluded) was found to be 21.7 kJ/mole at 298.16 K, which property support presence of the opened structure exclusively at around room temperature.

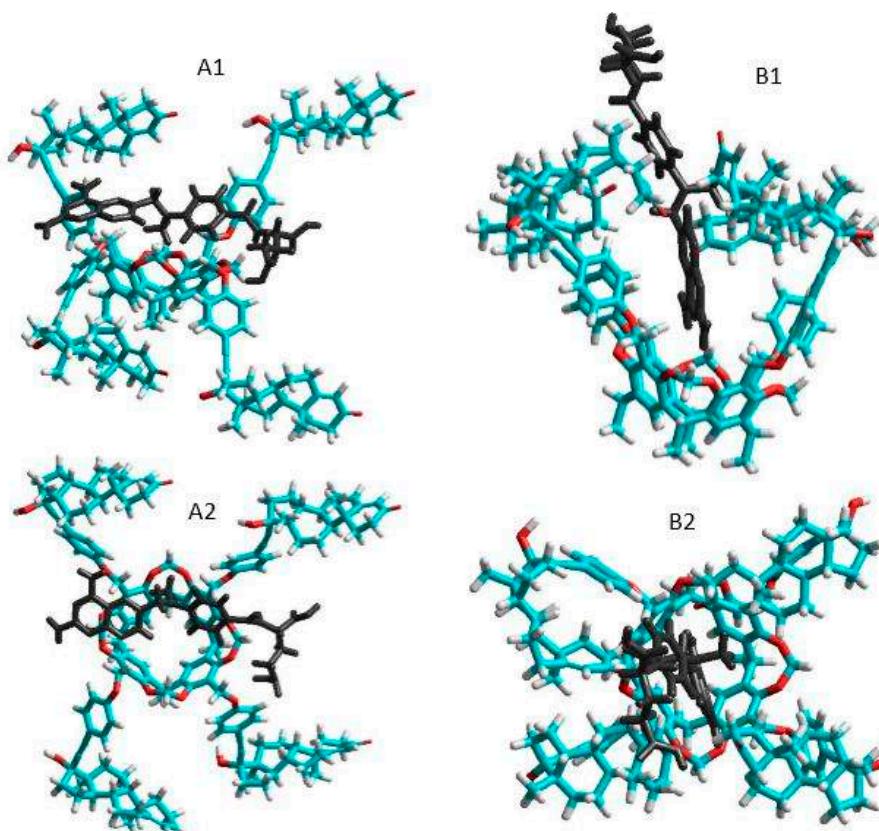


Figure 5. Side and top views of the equilibrium conformations of methotrexate–cavitand complexes associated with the opened (**A1** and **A2**) and closed (**B1** and **B2**) conformations of the cavitand (blue, red, white and black colors mean carbon, oxygen, hydrogen atoms and MTX molecule, respectively).

The thermodynamic parameters associated with the complex formation of the TAC with MTX were then calculated as described in the Materials and methods section. Results show positive enthalpy and entropy change during formation of the closed form complexes, while both the enthalpy and entropy term is negative when the complex show opened structure. Possible reason for these results is that the freedom of the flexible opened cavitand decreased considerably when the closed form complexes are stabilized. In contrast, the entropy gain can be obtained when the flexibility of the cavitand skeleton remains unchanged during formation of the opened complex structure. The good agreement between the experimental results derived in solution phase and that of the theoretical value calculated in gas phase reflects moderated entropy gain associated with the increased freedom of solvent molecules after leaving the solvation shell of the methotrexate guest.

3. Materials and Methods

3.1. Chemicals

Methotrexate (MTX) was obtained from Sigma-Aldrich. Tetrakis (androst-4-en-3-one-17 α -ethinyl)-cavitand (TAC) was synthesized in our institute according to a published method [17]. The applied solvent was dimethyl sulfoxide (DMSO) purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

Fluorimetric measurements were performed with a Fluorolog τ3 spectrofluorometer (Jobin-Yvon/SPEX, Longjumeau, France). Fluorescence spectra were recorded using 390 nm excitation wavelength. The emission values obtained at 540 nm were used for data evaluation. For data collection, photon counting method with 0.1 s integration time was used. Excitation and emission bandwidths were set to 2 nm. To avoid the inner filter effect, a 2 mm thickness of the fluorescent probes with right-angle detection was applied.

Considering the photosensitive character of MTX, the experimental setup was checked to confirm whether the measurement itself induces photodegradation of the MTX. To do that, the MTX samples were illuminated for 2 h using 390 nm light (the excitation wavelength). No considerable spectral changes were obtained which confirm stability of the MTX for the limited time of the measurements [18].

To determine the thermodynamic parameters associated with the complexation reaction of MTX and TAC, samples with constant concentration of MTX (10 μ M) and with different concentrations of TAC (0–80 μ M) were prepared in DMSO and measured immediately using 390 nm excitation wavelength at temperatures 293.0 K, 296.3 K, 299.7 K, 303.0 K, 306.3 K, 309.7 K and 313.0 K.

3.2. Data Evaluation

Stability constants (K , dm^3/mol) of MTX-TAC complexes were calculated either using the Benesi-Hildebrand equation, assuming 1:1 complex stoichiometry:

$$\frac{I_0}{I - I_0} = \frac{1}{A} + \frac{1}{A * K * [C]} \ln K \quad (1)$$

where I_0 and I are the fluorescence emission intensities of MTX in the absence and in the presence of the host, respectively; $[C]$ is the molar concentration of the host molecule while A is a constant.

Furthermore, association constants of the complex formation were also calculated by nonlinear fitting, based on the fluorescence emission data obtained, employing the HyperQuad2006 program package [19].

To determine the thermodynamic parameters, temperature dependence of the complex stabilities was examined, then the thermodynamic parameters were calculated using the van 't Hoff equation:

$$\ln K = -\frac{\Delta G}{RT} = \frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (2)$$

where the ΔH and ΔS stand for the enthalpy and entropy changes of the complex formation, respectively, while ΔG is the Gibbs free energy change. R is the gas constant, while T is the temperature in Kelvin.

3.3. Modeling Studies

Thermodynamic parameters of the MTX-TAC complexes were determined as follows. The enthalpy change was considered as the energy change calculated by subtracting the total energies of the reactants from the total energies of the products. Similarly, the entropy changes were calculated by subtracting the entropy terms of the reactants from the entropy terms of the products. Calculation of the entropy term

is implemented in the HyperChem code [20] as follows: after calculating the vibrational frequencies using the harmonic approximation, the entropy was then determined by the following equation:

$$S_{\text{vib}} = R \sum_i \left\{ \frac{h \frac{v_i}{kT}}{e^{(h \frac{v_i}{kT})} - 1} - \ln[1 - e^{(-h \frac{v_i}{kT})}] \right\} \quad (3)$$

where the v_i is the frequency of vibration and T is the temperature.

The total energies of the species interacted were calculated at semi-empirical AM1 level using HyperChem 8 code.

4. Conclusions

Photoluminescence and molecular modeling studies of inclusion complexes formed by the antimetabolite drug, methotrexate and by the macrocyclic host molecule tetrakis(androst-4-en-3-one-17 α -ethinyl)-cavatand highlight two temperature regions where the complexes possess different conformations: opened structure of the host cavatand with free androst-4-en-3-one-17 α -ethinyl arms forms enthalpy stabilized structure while the stability of complexes formed by the closed form cavatand is stabilized by the entropy gain. This information can be applicable to design sensitive and selective molecular sensors for methotrexate drug.

Author Contributions: Conceptualization, Z.P. and S.K.-M.; data curation, Z.P. and B.L.; formal analysis, Z.P. and S.K.-M.; funding acquisition, S.K.-M.; investigation, Z.P. and Z.N.; methodology, Z.P. and S.K.-M.; resources, L.K. Writing—original draft, Z.P. and S.K.-M.; writing—review & editing, Z.P., Z.N., B.L., L.K. and S.K.-M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the GINOP-2.3.2-15-2016-00049 and 19-2.1.11-TÉT-2019-00042 grants.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Friedman, B.; Cronstein, B. Methotrexate mechanism in treatment of rheumatoid arthritis. *Jt. Bone Spine* **2019**, *86*, 301–307. [[CrossRef](#)]
2. Tian, H.; Cronstein, B.N. Understanding the mechanisms of action of methotrexate. *Bull. NYU Hosp. Jt. Dis.* **2007**, *65*, 168–173. Available online: <http://hjdbulletin.org/files/archive/pdfs/532.pdf> (accessed on 18 June 2020).
3. Chane, E.S.L.; Cronstein, B.N. Molecular action of methotrexate in inflammatory diseases. *Arthritis Res.* **2002**, *4*, 266–273. [[CrossRef](#)]
4. Cutolo, M.; Sulli, A.; Pizzorni, C.; Seriolo, B. Anti-inflammatory mechanisms of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **2001**, *60*, 729–735. [[CrossRef](#)]
5. Fahmy, S.A.; Brüßler, J.; Alawak, M.; El-Sayed, M.M.H.; Bakowsky, U.; Shoeib, T. Chemotherapy Based on Supramolecular Chemistry: A Promising Strategy in Cancer Therapy. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 292. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Hoskins, C.; Curtis, A.D.M. Simple Calix[n]arenes and Calix[4]resorcinarenes as Drug Solubilizing Agents. *J. Nanomed. Res.* **2015**, *2*, 00028. [[CrossRef](#)]
7. Neda, I.; Vollbrecht, A.; Grunenberg, J.; Schmutzler, R. Functionalization of the Periphery of Calix[4]resorcinarenes with P(III)-containing Substituents via Hydroxy-, Trimethylsiloxy- and Ethoxy-Tethered Trimethylsiloxy Intermediates. *Heteroatom Chem.* **1998**, *9*, 553–558. [[CrossRef](#)]
8. Franz, M.H.; Iorga, M.; Maftei, C.V.; Maftei, E.; Neda, I. Studies on the constituents of *Helleborus purpurascens*: Use of derivatives from calix[6]arene, homooxa-calix[3]arene and homoazacalix[3]arene as extractant agents for amino acids from the aqueous extract. *Amino Acids* **2020**, *52*, 55–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Maftei, V.; Fodor, E.; Jones, P.G.; Franz, M.H.; Davidescu, C.M.; Neda, I. Asymmetric Calixarene Derivatives as Potential Hosts in Chiral Recognition Processes. *Pure Appl. Chem.* **2015**, *87*, 415–439. [[CrossRef](#)]
10. Dieleman, B.; Matt, D.; Neda, I.; Schmutzler, R.; Harriman, A.; Yaftian, R. Hexahomotrioxacalix[3]arene: A scaffold for a C₃-symmetric phosphine ligand that traps a hydro-rhodium fragment inside a molecular funnel. *Chem. Commun.* **1999**, 1911–1912. [[CrossRef](#)]

11. Kunze, C.; Selent, D.; Neda, I.; Schmuzler, R.; Spannenberg, A.; Börner, A. Synthesis of New Calix[4]arene-Based Phosphorus Ligands and Their Application in the Rh(I) Catalyzed Hydroformylation of 1-Octene. *Heteroatom Chem.* **2001**, *12*, 577–585. [[CrossRef](#)]
12. Bourkaib, N.; Zhou, J.; Yao, J.; Fang, Z.; Mezghrani, O. Combination of β -cyclodextrin inclusion complex and self-microemulsifying drug delivery system for photostability and enhanced oral bioavailability of methotrexate: Novel technique. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2013**, *39*, 918–927. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Pattarino, F.; Giovannelli, L.; Giovenzana, G.B.; Rinaldi, M.; Trotta, M. Inclusion of methotrexate in alkyl-cyclodextrins: Effects of host substitutents on the stability of complexes. *J. Drug Del. Sci. Tech.* **2005**, *15*, 465–468. [[CrossRef](#)]
14. Aykaç, A.; Martos-Maldonado, M.C.; Casas-Solvas, J.M.; García-Fuentes, L.; Vargas-Berenguel, A. Binding ability properties of β -cyclodextrin dimers linked through their secondary faces towards cancer chemotherapeutic agent methotrexate. *J. Drug Del. Sci. Tech.* **2012**, *22*, 270–272. [[CrossRef](#)]
15. Chang, Y.-X.; Zhang, X.-M.; Duan, X.-C.; Liu, F.; Du, L.-M. Supramolecular interaction of methotrexate with cucurbit[7]uril and analytical application. *Spectrochim. Acta* **2017**, *183*, 131–137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Shalaeva, Y.V.; Morozova, J.E.; Syakaev, V.V.; Ermakova, A.M.; Nizameev, I.R.; Kadirov, M.K.; Kazakova, E.K.; Konovalov, A.I. Formation of cooperative amidoaminocalixresorcinarene–methotrexate nanosized aggregates in an aqueous solution and on the surface of gold nanoparticles. *Supramol. Chem.* **2018**, *30*, 901–910. [[CrossRef](#)]
17. Nagymihály, Z.; Wölfling, J.; Schneider, G.; Kollár, L. Synthesis of 2-methylresorcinol-based deepened cavitands with chiral inlet bearing steroidal moieties on the upper rim. *ChemistrySelect* **2020**, *5*, 6933–6938. [[CrossRef](#)]
18. Pascu, M.L.; Staicu, A.; Voicu, L.; Brezeanu, M.; Carstocea, B.; Pascu, R.; Gazdaru, D. Methotrexate as a Photosensitiser. *Anticancer Res.* **2004**, *24*, 2925–2930. Available online: <http://ar.iiarjournals.org/content/24/5A/2925.long> (accessed on 18 June 2020).
19. Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A. Investigation of equilibria in solution. Determination of equilibrium constants with the HYPERQUAD suite of programs. *Talanta* **1996**, *43*, 1739. [[CrossRef](#)]
20. HyperChem, Hypercube Inc. 2007. Available online: <http://www.hyper.com/> (accessed on 18 June 2020).



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Article

Comparative EPR Study on the Scavenging Effect of Methotrexate with the Isomers of Its Photoswitchable Derivative

Zsolt Preisz ^{1,2}, Nóra Hartvig ³, Balázs Bognár ¹ , Tamás Kálai ^{1,3} and Sándor Kunsági-Máté ^{1,2,3,*} 

¹ Institute of Organic and Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Pécs, Szigeti 12, H-7624 Pécs, Hungary; preisz.zsolt@pte.hu (Z.P.); balazs.bognar@aok.pte.hu (B.B.); tamas.kalai@aok.pte.hu (T.K.)

² Department of General and Physical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Pécs, Ifjúság 6, H-7624 Pécs, Hungary

³ János Szentágothai Research Center, University of Pécs, Ifjúság 20, H-7624 Pécs, Hungary; nora.hartvig@gmail.com

* Correspondence: sandor.kunsagi-mate@aok.pte.hu



Citation: Preisz, Z.; Hartvig, N.; Bognár, B.; Kálai, T.; Kunsági-Máté, S. Comparative EPR Study on the Scavenging Effect of Methotrexate with the Isomers of Its Photoswitchable Derivative. *Pharmaceutics* **2021**, *14*, 665. <https://doi.org/10.3390/ph14070665>

Academic Editor: Maria Stefania Sinicropi

Received: 24 May 2021

Accepted: 7 July 2021

Published: 11 July 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The scavenging effect of the antimetabolite dihydrofolate reductase inhibitor methotrexate (MTX) and the isomers of its photoswitchable derivative, *cis*- and *trans*-phototrexate (PHX), have been compared by ESR spectroscopy, with the application of a cyclic hydroxylamine spin probe. The results showed the most pronounced scavenging effect in the presence of *trans*-phototrexate (*trans*-PHX). At a low concentration (100 μM) *cis*-PHX also showed a greater scavenging effect than the parent molecule MTX. Direct antioxidant properties of the investigated molecules were measured by ABTS scavenging assay, which showed no significant difference between *trans*-PHX and *cis*-PHX, but both of the isomers of PHX showed a higher antioxidant capacity than MTX. These findings imply that *trans*-PHX may have more pronounced anti-inflammatory and tissue-protective effects than MTX, despite the lack of its cytotoxic, antineoplastic effect.

Keywords: methotrexate; phototrexate; photopharmacology; photoswitchable; electron paramagnetic resonance (EPR); scavenger

1. Introduction

Chemotherapy (the use of cytotoxic agents) is one of the main methods that are applied in cancer treatment, together with radiation therapy, hormone therapy, and surgery. However, the efficacy of chemotherapy is often limited because of the low therapeutic indices and poor adverse effect profiles of these agents [1]. The lack of disease-specific targeting stands in the background of this phenomenon. The most common adverse effects of chemotherapeutic agents are cardiomyopathy, hepatic fibrosis, pulmonary fibrosis, renal insufficiency, nodulosis, lethargy, and fatigue [2,3].

Methotrexate (4-amino-10-methylfolic acid, MTX, Figure 1) is an antimetabolite dihydrofolate reductase (DHFR) inhibitor. It is a widely used chemotherapeutic agent in autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis (RA), psoriasis, and some sorts of leukaemia [4]. The anti-inflammatory effect of MTX is well-known, but its mechanisms of action are not well understood, several molecular phenomena are described in the literature that can play a role in the development of this effect (inhibition of purine and DNA synthesis, reduction of antigen-dependent T-cell proliferation, promotion of adenosine release, suppression of transmethylation reaction) [2,4,5].

However, MTX has a poor drug safety profile caused by the ubiquity of DHFR [6]. Its most common adverse effects are ulcerative stomatitis, leukopenia, nausea, abdominal distress, malaise, undue fatigue, chills and fever, dizziness, and decreased resistance to infection [7]. Several attempts were made to reduce the side effects of MTX, and some of

them have proven to be effective, for example, the concurrent use of leucovorin (folinic acid). This adjuvant does not interfere with the efficacy of methotrexate in a clinically significant manner, but significantly reduces the common side effects of low-dose MTX therapy [8].

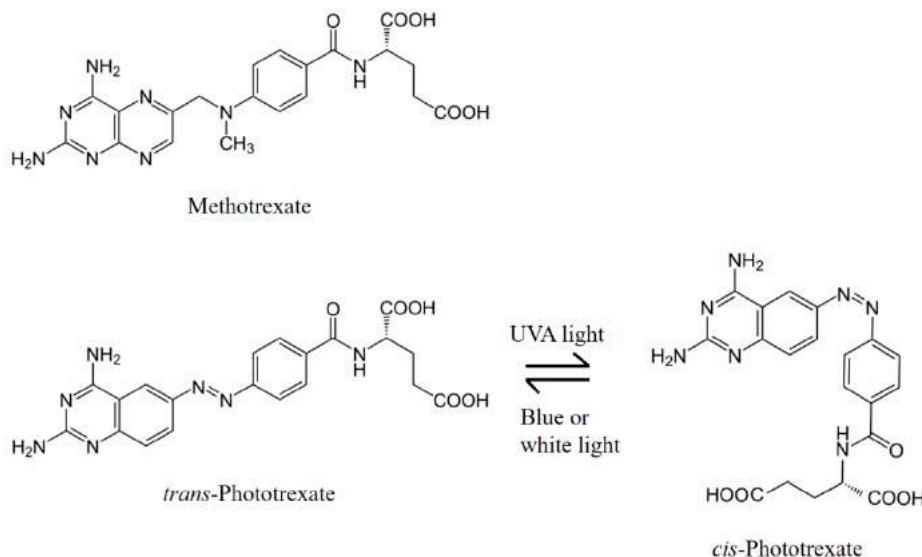


Figure 1. Chemical structures of methotrexate (MTX), *trans*-phototrexate (*trans*-PHX), *cis*-phototrexate (*cis*-PHX), and the reversible isomerization of PHX [6].

To activate the drugs exclusively at their target place of action is a promising approach to improve cancer therapies, and synthetical photoswitches can be suitable tools to achieve this. Photoswitches are chromophores that can be reversibly isomerized when exposed to light. The field that attempts to control biological activity with these molecules is called photopharmacology [9]. Azobenzene is the most widely used photoswitch in biological applications because of the ease of synthesis and functionalization, fast photo-isomerization, and the low rate of photo-bleaching [10,11].

PHX is a photoswitchable azobenzene analogue of MTX that has been synthesized and described by C. Matera et al. [6] and by Mashita et al. [12]. PHX contains a diazene stereogenic unit and its pharmacological activity is higher in its *cis* state than in the more thermodynamically stable *trans* state. It can be effectively isomerized from *trans* to *cis* with UVA light (375 nm) and back-isomerized from *cis* to *trans* with blue (460 nm) or white light (Figure 1). This transition is reversible and can be repeated several times. The antineoplastic effect (and also the adverse effects caused by the cytotoxic activity) appears only in light-exposed regions and decreases in dark regions. Target tissues that can be exposed to UV-illumination are primarily the skin, the digestive, respiratory, and reproductive tracts.

Clinically, MTX reduces the risk of cardiovascular events caused by cardiovascular disease (CVD) which is also recognized as a chronic inflammatory condition [13–15]. Modified lipoproteins are assumed to play an important role in the development and progression of CVD. These modified lipoproteins increase oxidative stress and lipid peroxidation, which lead to the increase of reactive oxygen species (ROS) and malondialdehyde–acetaldehyde (MAA) production. The elevated levels of these reactive products have been detected in RA and also in CVD cases [16,17]. It has been described that MTX inhibits malondialdehyde–acetaldehyde–protein adduct formation and scavenges superoxide radicals [18], but these features have never been investigated in the case of *trans*- or *cis*-PHX yet.

EPR spectroscopy has long been a method of choice for the detection of paramagnetic species, such as free radicals or transition metal ions in vitro. EPR spectroscopy in association with molecular probes has been successfully applied to the evaluation of the

redox status of tumors or in rodent models of diverse pathological conditions, such as hypertension, stroke, epilepsy, and sepsis [19]. In this study, 1-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-piperidin-4-ol (*N*-hydroxy-TEMPOL), a cyclic hydroxylamine, was used as a spin probe for EPR measurements. Cyclic aminoxy radicals with tetraalkyl substituents flanking the N-O[•] functionality are most often used as probes for the redox status in vivo [20]. Hydroxylamines (in contrast with spin traps) do not have the ability to bind (trap) free radicals. They can undergo oxidation to stable nitroxides, and the nitroxide accumulation can be followed by EPR. Hydroxylamines rapidly react with oxygen-centered free radicals, including superoxide, peroxy radical, or peroxy nitrite [21]. These stable hydroxylamines can also participate in redox reactions with biological compounds or enzymes and thus report on the redox status of the cell by shuttling between the three forms shown in Figure 2a. Figure 2b summarizes the possible redox process associated with the interaction of the superoxide radical with the MTX and PHX molecules.

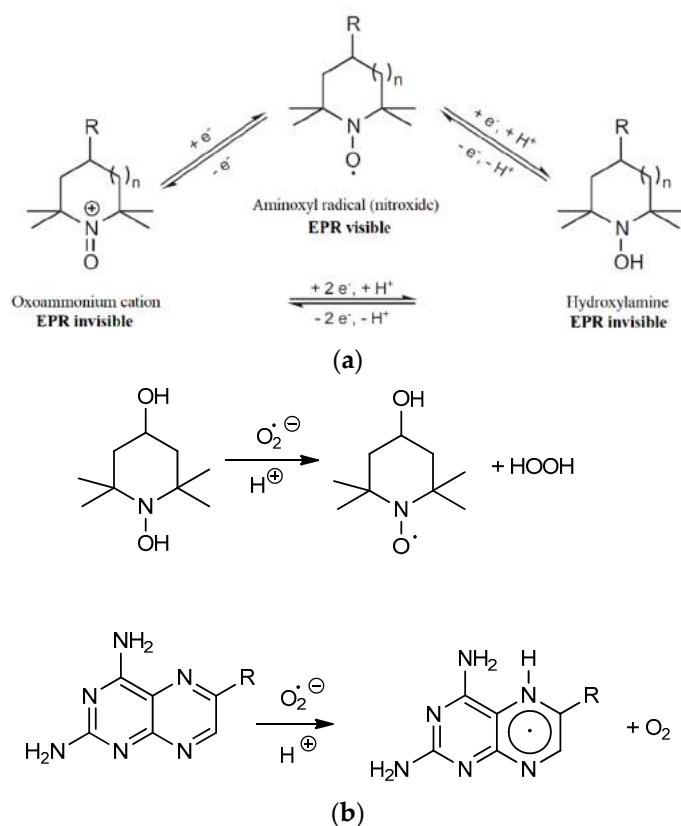


Figure 2. (a) (top) Redox species associated with cyclic hydroxylamine spin probe molecules ($n = 0$ or 1, pyrrolidine or piperidine) [20]. (b) (bottom) Proposed redox processes associated with the quenching of superoxide radical by oxidation of hydroxylamine and the reduction of the 1,4-diazine unit of MTX.

By adopting the method established well by Zimmerman et al. [18] we intended to compare the superoxide scavenging activity of methotrexate and *cis*- and *trans*-phototrexate by means of 1-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-piperidin-4-ol (*N*-hydroxy-TEMPOL), as a O₂^{•-} radical scavenger. The direct antioxidant properties of MTX, *trans*-PHX, and *cis*-PHX, were also investigated by ABTS scavenging assay. PHX is a relatively new molecule, which has already attracted attention [3], but its antioxidant activity has not been investigated before.

2. Results

2.1. Absorbance Spectra of Trans-PHX before and after EPR Measurements

To make sure that *trans*-PHX does not suffer isomerization or other molecular modification as a result of EPR measurements, UV-vis spectra were recorded before and after the EPR measurement (Figure 3). EPR measurements are taken in 30 min. There is no significant difference between the two spectra, so it was found that the 9.1 GHz microwave irradiation of EPR does not cause any change in the *trans*-PHX molecule. The applied concentration of *trans*-PHX was 50 μ M.

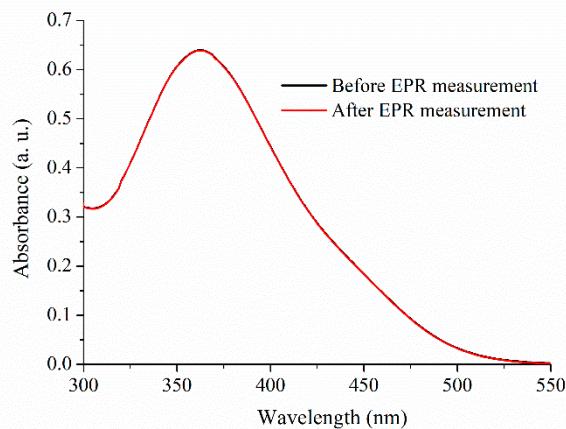


Figure 3. UV-vis absorption spectra of *trans*-PHX samples before and after EPR measurement.

2.2. Isomerization of Trans-PHX

To investigate the direct antioxidant properties of *cis*-PHX, the complete isomerization of the thermodynamically stable *trans*-PHX has to be reached. To this purpose UV-light exposure was used ($\lambda = 366$ nm). To examine the time dependence of the photoisomerization, a sample containing 50 μ M of *trans*-PHX was exposed to UV-light and the process was followed by spectrophotometrical measurements (Figure 4). According to these measurements, the complete isomerization of PHX (from *trans* to *cis*) was reached after approximately 15 min of UV-light exposure.

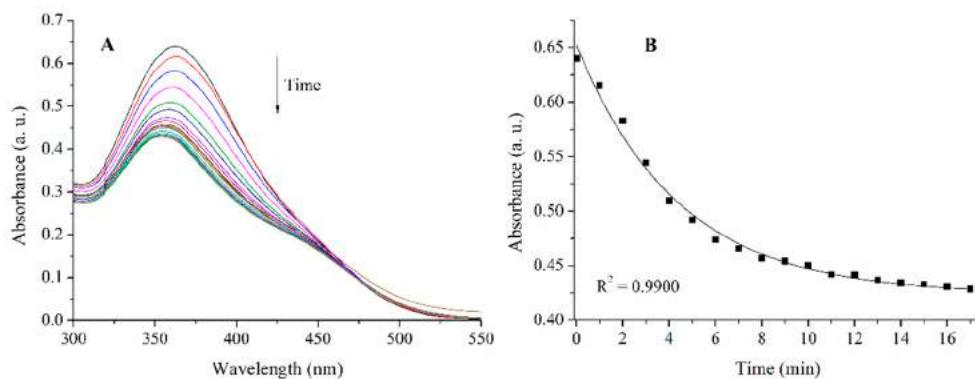


Figure 4. UV-vis spectra of a 50 μ M solution of *trans*-PHX exposed to 366 nm light (A) and the intensity of the peak at 360 nm plotted against time (B). The first spectrum was recorded before the beginning of the UV-light exposure, then measurements were taken every minute.

2.3. Results of EPR Measurements

To determine the direct antioxidant properties of MTX, *trans*-PHX, and *cis*-PHX, EPR spectra of samples containing 0 μ M, 100 μ M, 500 μ M, 2 mM, 5 mM MTX and 0 μ M, 100 μ M, 500 μ M and 2 mM *trans*-PHX, and *cis*-PHX were recorded (Figure 5). The average amplitudes of the EPR-peaks were investigated in all cases.

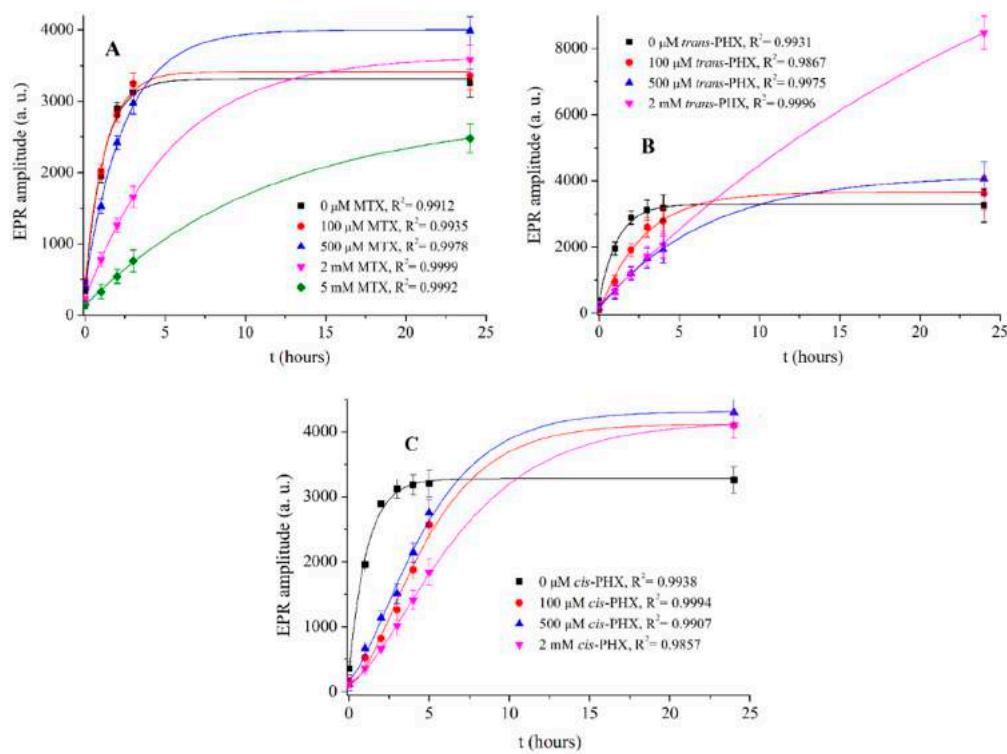


Figure 5. The amplitudes of EPR signals of samples containing 0–5 mM MTX (A), 0–2 mM *trans*-PHX (B) and, 0–2 mM *cis*-PHX (C) plotted against time.

The rate of the production of reactive oxygen species (ROS) has the ability to be very informative, due to the fact that when this rate reaches the saturation level of the biological scavenger systems (e.g., superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase), the cells will be exposed to oxidative stress. The difference between the maxima of curves is less significant. The reason for the high amplitude values of the sample containing 2 mM *trans*-PHX is not clear yet. The rate of ROS production has not been applied yet for describing the scavenging effect of MTX and PHX. It is observable that the rate of ROS production decreases with the increasing concentrations of MTX and *trans*-PHX, but this effect is more pronounced in the presence of *trans*-PHX. It is important to note that this decrease is not the result of XO inhibition [18]. Based on the curves in Figure 2, the $\ln k$ kinetic parameters of all of the samples were determined (Table 1). It was found that *trans*-PHX slows down the ROS production to a greater extent than MTX at all of the investigated concentration levels. This inhibition effect is also more pronounced in the presence of *cis*-PHX when compared to MTX at 100 μ M concentration, but at higher concentrations, MTX had a greater effect than *cis*-PHX. This effect is higher in the presence of *trans*-PHX than in *cis*-PHX. We note that the $\ln k$ values that were calculated to determine the effect of *cis*-PHX may not be entirely accurate. This is for the reason that the sigmoidal shape of the related curves may reflect for example, the presence of autocatalytic steps. Since the absorption spectra recorded before and after the measurements do not reflect any changes in the *cis*-PHX conformation, further investigations are required to clarify the complex reaction mechanism.

The significance of the scavenging effect of MTX, *cis*-PHX, and *trans*-PHX, has been investigated by performing two-way ANOVA statistics implemented in the OriginLab 8.1 software (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). The population means related to the concentration of the antimetabolite drugs or their categories (MTX, *cis*-PHX, or *trans*-PHX) were found to be significantly different at the significance level of 0.05 ($p = 2.59 \times 10^{-8}$ and $p = 1.710 \times 10^{-5}$ for concentration and drug categories, respectively).

Table 1. The calculated $\ln k$ values of the samples investigated.

Concentration (μM)	MTX	<i>trans</i> -PHX	<i>cis</i> -PHX
	$\ln k$	$\ln k$	$\ln k$
0	-8.70 ± 0.16	-8.69 ± 0.18	-8.68 ± 0.15
100	-8.79 ± 0.23	-9.56 ± 0.15	-9.16 ± 0.25
500	-9.46 ± 0.21	-10.46 ± 0.28	-9.19 ± 0.26
2000	-10.25 ± 0.25	-11.96 ± 0.23	-9.51 ± 0.29
5000	-11.01 ± 0.20	-	-

Control samples that only contained TEMP solution and HX/XO solution were measured as well, to demonstrate that the spin probe (TEMP) alone does not generate any significant EPR signal, but it is needed to indicate the presence of ROS (Figure 6).

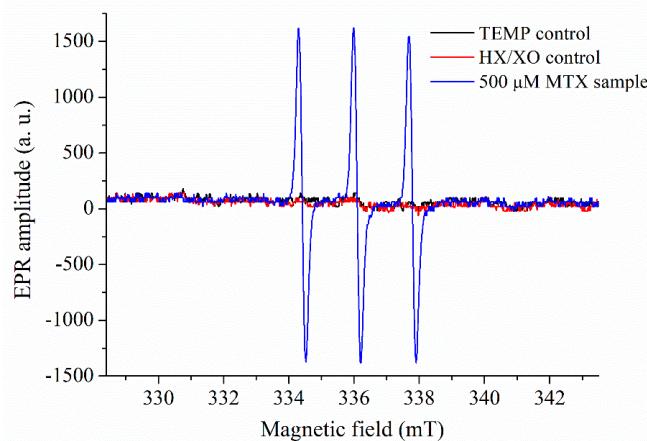


Figure 6. EPR spectra of the controls compared to the sample containing 500 μM MTX. All spectra were recorded 3 h after sample preparation.

2.4. Results of ABTS Scavenging Assay

The Trolox equivalent antioxidant capacities (TEAC) of MTX, *trans*-PHX, and *cis*-PHX, were determined using ABTS (2,2'-azinobis[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]) assay, which monitors electron and proton donor activity [22]. The method is based on the green-colored ABTS•⁺ radical, which is detected at 734 nm. Results are depicted in Figure 7.

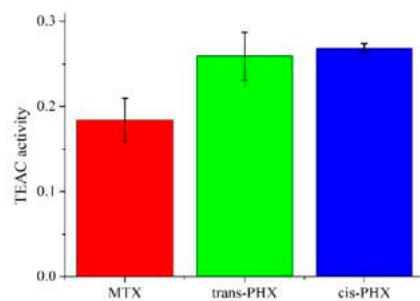


Figure 7. Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) of methotrexate (MTX), *trans*-phototrexate (*trans*-PHX), and *cis*-phototrexate (*cis*-PHX) measured by ABTS radical scavenging assay. Data represent the mean \pm SD ($n = 3$).

There was no significant difference between the TEAC values of *trans*-PHX and *cis*-PHX, but both of the isomers of PHX showed a higher antioxidant capacity than MTX.

3. Discussion

The role of antirheumatic drugs in cardiovascular disease prevention has been an intensively researched field in the last decade [23–25]. Colchicine is the first anti-inflammatory molecule to have been shown in a randomized, double-blind trial to be effective in the secondary prevention of myocardial infarction [26].

Compared with the general population, patients with rheumatoid arthritis (RA) have an increased risk of cardiovascular disease (CVD) or events (CVE) [27] and reduced survival [28]. In patients with RA, treatment with tumor necrosis factor (TNF) inhibitors or MTX was associated with a 30% and 28% reduction in the risk of CVEs, respectively [29].

The ability to scavenge O_2^- appears to be a mechanism by which MTX inhibits the formation of malondialdehyde–acetaldehyde (MAA) adducts. The inhibition of MAA adduct formation and scavenging of free radicals may reduce the inflammation associated with CVD and RA, thereby reducing tissue damage [18].

Phototrexate is a relatively new molecule, therefore very few publications can be found in the literature about it. It has been synthesized and characterized by Matera et al. and its antifolate and antiproliferative properties have been demonstrated by *in vitro* and *in vivo* assays [6]. PHX has been derived by azologization and bioisosteric substitutions of MTX. PHX is a photoswitchable molecule, it can be switched on by UV light exposure and switched off by blue or white light or by thermal relaxation in the dark. Its *cis* isomer's effect is very similar to the effect of MTX, while it is almost inert as an antifolate in its *trans* configuration [6].

In this study, the ROS-scavenging effect of *trans*-PHX, *cis*-PHX, and MTX, was investigated and compared to each other by an EPR spectroscopy method [18]. EPR spectra of *cis*- and *trans*-PHX were recorded and the direct antioxidant properties of these molecules were described for the first time. Kinetic parameters (rate k) were determined and it was found that *trans*-PHX has a more pronounced scavenging effect than MTX and *cis*-PHX. This effect is found to be greater in the presence of *cis*-PHX compared to MTX at lower concentrations. The results of MTX are in line with the study published by Zimmermann et al. [18].

ABTS scavenging assay measurements were also carried out to investigate the antioxidant properties (TEAC values) of MTX and the isomers of PHX. These experiments showed no significant difference between the scavenging effect of *trans*-PHX and that of the *cis*-PHX, but these experiments confirm that both of the isomers of PHX showed a higher antioxidant capacity than MTX.

The reason for the slightly different results of the applied methods is likely due to the methodological difference between these methods. The EPR spectroscopy method is applicable to examine the superoxide radical scavenging activity of the investigated molecules, while by the ABTS scavenging assay the ABTS^{•+} radical scavenging activity was measured.

Despite the slight differences between the two experiments applied here, it can be assumed that *trans*-PHX may have more pronounced anti-inflammatory and tissue-protective effects than MTX. This finding is very interesting because *trans*-PHX lacks the cytotoxic and antineoplastic effects of MTX and *cis*-PHX [6]. Further investigations are required to clarify the mechanism of action of *trans*-PHX and thereby the exact molecular background of this effect.

4. Materials and Methods

Methotrexate (MTX), 1-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-piperidin-4-ol (N-hydroxy-TEMPOL), xanthine oxidase (XO, from bovine milk), and hypoxanthine (HX) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). *Trans*-phototrexate (*trans*-PHX) was synthesized in our institute according to the scheme published recently [6].

The applied solvent was a Krebs-HEPES EPR buffer consisting of: NaCl (99 mM), KCl (4.69 mM), CaCl₂ (2.5 mM), MgSO₄ (1.2 mM), NaHCO₃ (25 mM), KH₂PO₄ (1.03 mM), D-glucose (5.6 mM), HEPES (20 mM), diethyl dithio carbamic diethylammonium salt (DETC,

5 μ M), and deferoxamine (25 μ M) [30]. The buffer was adjusted to pH 7.4 with HCl. All of the compounds were purchased from Sigma-Aldrich.

A MiniScope MS 200 (Magnetech GmbH, Berlin, Germany) spectroscope was utilized to detect the produced free radicals and to examine the scavenging ability of MTX. The amplitude of the EPR signal is proportional to the number of unpaired electrons present in the sample, facilitating the quantification of free radicals [31]. The amplitudes were determined using the MiniScopeCtrl software.

The following EPR spectrometer settings were applied for all experiments: B0-field: 335.9723 mT, range: 15.0727 mT, sweep time: 30.0 s, modulation: 0.200 mT, and microwave attenuation: 10.0 dB. TEMP was utilized as an EPR spin probe. All measurements were carried out at room temperature (298 K).

To determine if MTX, *trans*-PHX, or *cis*-PHX directly scavenges free radicals, hypoxanthine (HX) and xanthine oxydase (XO) were used (the HX/XO system produces free radicals, primarily O_2^-). 1 mL samples were prepared with 100 μ M TEMP, 20 μ M HX, 10 mU/mL XO and 0–5 mM MTX or 0–2 mM PHX in 1 mL of EPR buffer. 50 μ L of the sample was then loaded into a glass capillary tube and inserted into the capillary holder of the EPR spectrometer. Control samples with TEMP solution alone and with HX/XO solution alone were measured as well.

The thermodynamically stable but pharmacologically inactive *trans*-PHX was isomerized with the application of UV-light ($\lambda = 366$ nm) provided by a Fluotest lamp (Original Hanau, Hanau, Germany). To ensure the complete isomerization, UV-vis spectra were recorded by a Specord Plus 210 spectrophotometer (Analytik Jena, Jena, Germany). For data collection, the photon counting method with 0.1 s integration time was used and 2 nm bandwidths set and quartz cuvettes with 1.0 cm thickness were applied. The EPR spectra were registered every hour for all of the samples. This measurement lasts 5 min. When *cis*-PHX was measured, the samples were continuously exposed to UV-light ($\lambda = 366$ nm) to prevent the isomerization.

ABTS scavenging assays were carried out with the application of a Specord 40 spectrophotometer (Analytik Jena, Jena, Germany). 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) was solved in phosphate-buffered saline (PBS) that was composed of NaCl (137 mM/L), KCl (2.7 mM/L), NaH₂PO₄ (8 mM/L), and K₂HPO₄ (1.5 mM/L). The concentration of ABTS was 7 mM. ABTS radical cation (ABTS^{•+}) was produced by reacting ABTS stock solution with potassium persulfate at a final concentration of 2.45 mM and allowing the mixture to stand in the dark at room temperature for 16 h before use. For the study of compounds, the ABTS^{•+} solution was diluted with PBS to an absorbance of 0.70 (± 0.02) at 734 nm and equilibrated at 37 °C. Stock solutions of MTX, *trans*-PHX, *cis*-PHX, and Trolox (a water-soluble derivative of vitamin E with antioxidant properties) in PBS were added to the diluted ABTS^{•+} solution, in final concentrations of 12.5, 10, 7.5, and 2.5 μ M. After this step, the mixtures were incubated for 6 min at 37 °C before measuring their absorbance at 734 nm. All measurements were carried out three times. The percentage inhibition of absorbance at 734 nm is calculated with the usual formula:

$$(A_0 - A_{\text{antioxidant}})/A_0 = \text{inhibition (\%)} \quad (1)$$

where A_0 is the absorbance of the diluted ABTS^{•+} solution. The concentration–response curves of the investigated molecules were compared with the curve of Trolox.

5. Conclusions

Using cyclic hydroxylamine spin probe the superoxide scavenging effect of the antimetabolite dihydrofolate reductase inhibitor methotrexate (MTX) and the isomers of its photoswitchable derivate, *cis*- and *trans*-phototrexate (PHX), have been compared by ESR spectroscopy. The *trans*-phototrexate (*trans*-PHX) showed the most pronounced scavenging effect, while at a low concentration (100 μ M) *cis*-PHX also showed a greater scavenging effect than the parent molecule MTX. Trolox equivalent antioxidant capacity

(TEAC) values of these molecules have been determined by ABTS scavenging assay. There was no significant difference between the TEAC values of trans-PHX and cis-PHX, but both of the isomers of PHX showed a higher antioxidant capacity than MTX. These findings imply that trans-PHX may have more pronounced anti-inflammatory and tissue-protective effects than MTX, despite the lack of its cytotoxic, antineoplastic effect.

Author Contributions: Conceptualization, Z.P. and S.K.-M.; methodology, Z.P., N.H., B.B., T.K. and S.K.-M.; formal analysis, Z.P.; investigation, Z.P.; resources, S.K.-M., T.K.; data curation, Z.P., N.H. and B.B.; writing—original draft preparation, Z.P. and S.K.-M.; writing—review and editing Z.P. and S.K.-M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in the main text.

Acknowledgments: This work was supported by the GINOP-2.3.2-15-2016-00049, 2019-2.1.11-TÉT-2019-00042, and TKP2020-IKA-08 grants. The project has also been supported by the European Union, co-financed by the European Social Fund EFOP-3.6.1.-16-2016-00004.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Senapati, S.; Mahanta, A.K.; Kumar, S.; Maiti, P. Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2018**, *3*, 7. [[CrossRef](#)]
2. Tian, H.; Cronstein, B.N. Understanding the mechanisms of action of methotrexate. *Bull. BYU Hosp. Jt. Dis.* **2007**, *65*, 168–173.
3. Mulatihan, D.; Guo, T.; Zhao, Y. Azobenzene Photoswitch for Isomerization-Dependent Cancer Therapy via Azo-Combretastatin A4 and Phototrexate. *Photochem. Photobiol.* **2020**, *96*, 1163–1168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Chane, E.S.L.; Cronstein, B.N. Molecularaction of methotrexate in inflammatory diseases. *Arthritis Res. Ther.* **2002**, *4*, 266–273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Cutolo, M.; Sulli, A.; Pizzorni, C.; Seriolo, B. Anti-inflammatory mechanisms of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **2001**, *60*, 729–735. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Matera, C.; Gomila, A.M.J.; Camarero, N.; Libergoli, M.; Soler, C.; Gorostiza, P. Photoswitchable Antimetabolite for Targeted Photoactivated Chemotherapy. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 15764–15773. [[CrossRef](#)]
7. Castillo, V.S.; Moyano, L.A. *Methotrexate: Pharmacology, Clinical Uses and Adverse Effects*; Nova Science Publishers: Hauppauge, NY, USA, 2012; ISBN 9781621005964.
8. Shiroky, J.B.; Neville, C.; Esdaile, J.M.; Choquette, D.; Zummer, M.; Hazeltine, M.; Bykerk, V.; Kanji, M.; St-Pierre, A.; Robidoux, L.; et al. Low-dose methotrexate with leucovorin (folic acid) in the management of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **1993**, *36*, 795–803. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Broichhagen, J.; Frank, J.A.; Trauner, D. A Roadmap to Success in Photopharmacology. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 1947–1960. [[CrossRef](#)]
10. Szymanski, W.; Beierle, J.M.; Kistemaker, H.A.; Velema, W.A.; Feringa, B.L. Reversible photocontrol of biological systems by the incorporation of molecular photoswitches. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 6114–6178. [[CrossRef](#)]
11. Banghart, M.R.; Mourot, A.; Fortin, D.L.; Yao, J.Z.; Kramer, R.H.; Trauner, D. Photochromic blockers of voltage-gated potassium channels. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9097–10001. [[CrossRef](#)]
12. Mashita, T.; Kowada, T.; Takahashi, H.; Matsui, T.; Mizukami, S. Light-wavelength based Quantitative Control of Dihydrofolate Reductase Activity Using Photochromic Isostere of Inhibitor. *ChemBioChem* **2019**, *20*, 1382–1386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Micha, R.; Imamura, F.; von Ballmoos, M.W.; Solomon, D.H.; Hernán, M.A.; Ridker, P.M.; Mozaffarian, D. Systematic review and meta-analysis of methotrexate use and risk of cardiovascular disease. *Am. J. Cardiol.* **2011**, *108*, 1362–1370. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Libby, P.; Ridker, M.; Hansson, G.K. Inflammation in atherosclerosis: From pathophysiology to practice. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2009**, *54*, 2129–2138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. *Nature* **1993**, *362*, 801–809. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Andreson, D.R.; Duryee, M.J.; Shurmur, S.W.; Um, J.Y.; Bussey, W.D.; Hunter, C.D.; Garvin, R.P.; Sayles, H.R.; Mikuls, T.R.; Klassen, L.W.; et al. Unique antibody responses to malondialdehyde-acetaldehyde (MAA)-protein adducts predict coronary artery disease. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e107440. [[CrossRef](#)]
17. Heinecke, J.W. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: Implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis* **1998**, *141*, 1–15. [[CrossRef](#)]

18. Zimmerman, M.C.; Clemens, D.L.; Duryee, M.J.; Sarmiento, C.; Chiou, A.; Hunter, C.D.; Tian, J.; Klassen, L.W.; O'Dell, J.R.; Thiele, G.M.; et al. Direct antioxidant properties of methotrexate: Inhibition of malondialdehyde-acetaldehyde-protein adduct formation and superoxide scavenging. *Redox Biol.* **2017**, *13*, 588–593. [[CrossRef](#)]
19. Babić, N.; Peyrot, F. Molecular Probes for Evaluation of Oxidative Stress by In Vivo EPR Spectroscopy and Imaging: State-of-the-Art and Limitations. *Magnetochemistry* **2019**, *5*, 13. [[CrossRef](#)]
20. Bačić, G.; Pavićević, A.; Peyrot, F. In vivo evaluation of different alterations of redox status by studying pharmacokinetics of nitroxides using magnetic resonance techniques. *Redox Biol.* **2016**, *8*, 226–242. [[CrossRef](#)]
21. Dikalov, S.I.; Polienko, Y.F.; Kirilyuk, I. Electron Paramagnetic Resonance Measurements of Reactive Oxygen Species by Cyclic Hydroxylamine Spin Probes. *Antioxid. Redox Signal.* **2018**, *28*. [[CrossRef](#)]
22. Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F. Anti-oxidant capacity of dietary polyphenols determined by ABTS assay: A kinetic expression of the results. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2006**, *43*, 185–191. [[CrossRef](#)]
23. Bartoloni, E.; Alunno, A.; Valentini, V.; Luccioli, F.; Valentini, E.; La Paglia, G.M.; Leone, M.C.; Cafaro, G.; Marcucci, E.; Gerli, R. Targeting Inflammation to Prevent Cardiovascular Disease in Chronic Rheumatic Diseases: Myth or Reality? *Front. Cardiovasc. Med.* **2018**, *5*, 177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Thanigaimani, S.; Phie, J.; Krishna, S.M.; Moxon, J.; Golledge, J. Effect of disease modifying anti-rheumatic drugs on major cardiovascular events: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 6627. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Lems, W.; Boers, M.; van Vollenhoven, R.F.; Nurmohamed, M. Antirheumatic drugs for cardiovascular disease prevention: The case for colchicine. *RMD Open* **2021**, *7*, e001560. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Tardif, J.; Kouz, S.; Waters, D.D.; Bertrand, O.F.; Diaz, R.; Maggioni, A.P.; Pinto, F.J.; Ibrahim, R.; Gamra, H.; Kiwan, G.S.; et al. Efficacy and Safety of Low-Dose Colchicine after Myocardial Infarction. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *381*, 2497–2505. [[CrossRef](#)]
27. Avina-Zubieta, J.A.; Thomas, J.; Sadatsafavi, M.; Lehman, A.J.; Lacaille, D. Risk of incident cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis: A meta-analysis of observational studies. *Ann. Rheum. Dis.* **2012**, *71*, 1524–1529. [[CrossRef](#)]
28. Solomon, D.H.; Karlson, E.W.; Rimm, E.B.; Cannuscio, C.C.; Mandl, L.A.; Manson, J.E.; Stampfer, M.J.; Curhan, G.C. Cardiovascular Morbidity and Mortality in Women Diagnosed With Rheumatoid Arthritis. *Circulation* **2003**, *107*, 1303–1307. [[CrossRef](#)]
29. Roubille, C.; Richer, V.; Starnino, T.; McCourt, C.; McFarlane, A.; Fleming, P.; Siu, S.; Kraft, J.; Lynde, C.; Pope, J.; et al. The effects of tumour necrosis factor inhibitors, methotrexate, non-steroidal anti-inflammatory drugs and corticosteroids on cardiovascular events in rheumatoid arthritis, psoriasis and psoriatic arthritis: A systematic review and meta-analysis. *Ann. Rheum. Dis.* **2015**, *74*, 480–489. [[CrossRef](#)]
30. Rosenbaugh, E.G.; Roat, J.W.; Gao, L.; Yang, R.-F.; Manickam, D.S.; Yin, J.-X.; Schultz, H.D.; Bronich, T.K.; Batrakova, E.V.; Kabanov, A.V.; et al. The attenuation of central angiotensin II-dependent pressor response and intra-neuronal signaling by intracarotid injection of nanoformulated copper/zinc superoxide dismutase. *Biomaterials* **2010**, *31*, 5218–5226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Dikalov, S.; Griendling, K.K.; Harrison, D.G. Measurement of Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Studies. *Hypertension* **2007**, *49*, 717–727. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]