

Indukált cirkuláris dikroizmus spektroszkópia alkalmazási lehetőségei gyógyszer-makromolekula komplexek vizsgálatára

Doktori értekezés

Dr. Kiss Eszter

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Horváth Péter, egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Fenyvesi Éva, vezető kutató
Dr. Schay Gusztáv, egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Klebovich Imre, egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Mándity István, egyetemi docens
Csörgeiné Dr. Kurin Krisztina, egyetemi docens

Budapest
2020

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	6
1. Bevezetés.....	8
1.1. A kiralitás.....	9
1.2. Makromolekulák.....	10
1.2.1. A dezoxiribonukleinsav (DNS).....	10
1.2.1.1. Szerkezet és típusok.....	10
1.2.1.2. DNS-kölcsönhatások típusai.....	12
1.2.1.3. DNS-en ható gyógyszermolekulák.....	13
1.2.1.4. Genotoxicitás.....	14
1.2.2. Ciklodextrinek (CyD-ek).....	15
1.2.2.1. Szerkezet és típusok.....	15
1.2.2.2. Komplexképzés.....	17
1.2.2.3. Analitikai felhasználás.....	18
1.2.2.4. Gyógyszerészeti vonatkozások.....	18
1.2.3. Fehérjék.....	20
1.2.3.1. Szerkezet és felépítés.....	20
1.2.3.2. Gyógyszerészeti vonatkozások.....	21
1.3. Gyógyszer-makromolekula kölcsönhatások vizsgálatára alkalmazott műszeres módszerek.....	21
1.3.1. Kiroptikai spektroszkópia.....	21
1.3.1.1. Optikai rotációs diszperzió (ORD).....	22
1.3.1.2. Cirkuláris dikroizmus (CD).....	22
1.3.1.3. Az indukált cirkuláris dikroizmus (ICD).....	23
1.3.1.4. A DNS CD spektroszkópiája.....	24
1.3.1.5. A fehérjék CD spektroszkópiája.....	26

1.3.1.6.	A DNS-gyógyszer kölcsönhatások CD spektroszkópiája	27
1.3.1.7.	CyD komplexek CD spektroszkópiája	29
1.3.1.8.	A fehérje-gyógyszer kölcsönhatások CD spektroszkópiája	29
1.3.2.	Egyéb spektroszkópiai módszerek.....	29
1.3.2.1.	UV/VIS spektroszkópia.....	29
1.3.2.2.	Fluoreszcens technikák	31
1.3.2.3.	Mágneses magrezonancia (NMR) spektroszkópia.....	32
1.3.3.	Elválasztástechnikai módszerek	34
1.3.4.	Egyéb módszerek.....	36
1.3.4.1.	Surface Plasmon Resonance (SPR).....	36
1.3.4.2.	Enzimatis mdszerek - „footprinting”.....	37
2.	Célkitűzések	38
3.	Módszerek	39
3.1.	A kísérletes munka során felhasznált anyagok	39
3.2.	CD spektroszkópia.....	39
3.2.1.	CD-melting mérések.....	40
3.3.	pUC18 plazmid DNS preparálás.....	40
3.4.	DF-STD-NMR mérések.....	41
3.5.	Stabilitási állandók számítása	41
4.	Eredmények.....	43
4.1.	DNS vizsgálatok	43
4.1.1.	pUC18 plazmid DNS felhasználhatóságának validálása.....	43
4.1.2.	Kurkumin és kurkuminoidok vizsgálata.....	47
4.1.3.	Szunitinib vizsgálata.....	50
4.1.4.	Arisztolochiasav I (ARS I) vizsgálata	54
4.2.	Ciklodextrin (CyD) komplexek vizsgálata	56

4.2.1.	Flukonazol (FLZ)	56
4.2.2.	Bifonazol (BIZ)	56
4.2.3.	Klotrimazol (CLZ).....	59
4.2.4.	Mikonazol (MIZ).....	61
4.2.5.	Tiokonazol (TIZ)	63
4.3.	Fehérjekötődési vizsgálatok.....	66
4.3.1.	Nimeszulid HSA-kötődésének vizsgálata	66
5.	Megbeszélés	68
5.1.	DNS vizsgálatok	68
5.1.1.	pUC18 plazmid DNS felhasználhatóságának validálása.....	68
5.1.2.	Kurkumin és kurkuminoidok vizsgálata.....	68
5.1.3.	Szunitinib vizsgálata.....	71
5.1.4.	Arisztolochiasav I (ARS I) vizsgálata	73
5.2.	Ciklodextrin (CyD) komplexek vizsgálata	74
5.2.1.	Flukonazol (FLZ)	75
5.2.2.	Bifonazol (BIZ)	75
5.2.3.	Klotrimazol (CLZ).....	76
5.2.4.	Mikonazol (MIZ).....	77
5.2.5.	Tiokonazol (TIZ)	78
5.3.	Fehérjekötődési vizsgálatok.....	79
5.3.1.	Nimeszulid HSA-kötődésének vizsgálata	79
6.	Következtetések	80
7.	Összefoglalás.....	82
8.	Summary	83
9.	Irodalomjegyzék.....	84
10.	Saját publikációk jegyzéke	96

10.1.	A disszertáció alapját képező publikációk	96
10.2.	A disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk	96
11.	Köszönetnyilvánítás	98

Rövidítések jegyzéke

A	adenin
ACyD	α -ciklodextrin
AGP	α_1 -glikoprotein
ARS I	arisztolochiasav I
BCS	biofarmáciai osztályozási rendszer (Biopharmaceutics Classification System)
BCyD	β -ciklodextrin
BIZ	bifonazol
BMI	kötődési index (binding mode index)
C	citozin
CD	cirkuláris dikroizmus
CE	kapilláris elektroforézis
ChE	csirke eritrocita (chicken erythrocyte)
CIS	komplekképzés indukálta kémiai eltolódás (complexation induced chemical shift)
CLZ	klotrimazol
CMBCyD	karboximetil- β -ciklodextrin
CT	borjú csecsemőmirigy (calf thymus)
CyD	ciklodextrin
DF-STD-NMR	difference frequency saturation transfer difference NMR
DMBCyD	dimetil- β -ciklodextrin
DMSO	dimetil-szulfoxid
DNS	dezoxiribonukleinsav
ECCD	exciton csatolt cirkuláris dikroizmus
EOF	elektroosmotikus áramlás
EtBr	etídium-bromid
FLZ	flukonazol
G	guanin
GC	gázkromatográfia
GCyD	γ -ciklodextrin

HPLC	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
HPBCyD	hidroxipropil- β -ciklodextrin
HSA	humán szérum albumin
ICD	indukált cirkuláris dikroizmus
$\log P$	oktanol/víz rendszerre vonatkoztatott megoszlási hányados logaritmus
MIZ	mikonazol
NMR	mágneses magrezonancia
ORD	optikai rotációs diszperzió
PSS	fázisoldhatósági vizsgálat (phase solubility study)
PSA	poláris molekulafelszín (polar surface area)
RMBCyD	random-metil- β -ciklodextrin
ROS	reaktív oxigén szabadgyök
SBBCyD	szulfobutiléter- β -ciklodextrin
SPR	surface plasmon resonance
SS	lazac sperma (salmon sperm)
T	timin
TIZ	tiokonazol
TMBCyD	trimetil- β -ciklodextrin
UV/VIS	spektroszkópia
	ultraibolya/látható spektroszkópia

1. Bevezetés

A természetes vegyületek jelentős részének jellemző tulajdonsága a szimmetria hiánya, azaz a kiralitás. Az élő szervezeteket felépítő és életfolyamataikat meghatározó makromolekulák építőelemeinél azonban egy speciális tulajdonság, a homokiralitás jelensége figyelhető meg, ami annyit jelent, hogy az őket felépítő monomerek azonos kiralitással rendelkeznek. Példaként hozható erre, hogy a fehérjéket felépítő aminosavak mindegyike *L*-aminosav, a poliszacharidok cukor építőkövei pedig mind a *D*-sorozatba tartoznak. A homokiralitás kialakulásának kutatása során két kérdésre próbálnak választ találni:

- mi lehetett az eredeti oka annak, hogy az egyik enantiomer szintézise előtérbe került,
- hogyan okozhatta az enantiomerek egyensúlyának megváltozása, hogy a különféle biológiai molekulák homokirálisak lettek?

A homokiralitás kialakulásának magyarázatára többféle fizikai, valamint kémiai teória létezik. Az aszimmetrikus autokatalízist először 1953-ban írták le, azonban laboratóriumi körülmények között csak 1995-ben sikerült megvalósítani. Ennek során egy királis molekula katalizálja saját szintézisét, ugyanakkor elnyomja enantiomerpárjának a szintetizálását. Leírtak olyan esetet, amikor az enantiomer mennyisége 0,1%-ról indulva 85%-ra nőtt meg a reakció végbemenetele során[1].

A királis vegyületek kétféle módon kristályosodhatnak. Az egyik esetben az enantiomerek külön homogén kristályokat alkotnak, konglomerátumokat hoznak létre, a másik esetben a két enantiomer együtt kristályosodik. Ennek egyik fajtája, amikor a két izomer 1:1 arányban van jelen, ekkor beszélünk racém elegyekről. NaClO_3 oldatok vizsgálata során fedezték fel, hogy bizonyos körülmények között, mint például erős kevertetés hatására csak az egyik „jobb- vagy balkezes” kristály válik ki. Ezt azzal magyarázzák, hogy ha a kristályosodási folyamat során először megjelenő szilárd részecske a kevertetés hatására több kisebb kristályra törik szét (amiknek kiralitása azonos), akkor energetikailag kedvezőbb folyamat a kristályok növekedése ezeken a göcökön, minthogy újabb kristály képződjön. Szintén enantiomerfelesleg alakulhat ki oldatokban, ha a heterokirális kristályok oldhatósága számottevően alacsonyabb, mint a homokirális kristályé[2].

1.1. A kiralitás

Királisnak nevezzük azokat a vegyületeket, amelyek elforgatják a síkban polarizált fény síkját. Ez a tulajdonság a molekulák térszerkezetére (konfiguráció), valamint az abban található szimmetria bizonyos mértékű hiányára vezethető vissza. A tulajdonság felfedezése Louis Pasteur nevéhez köthető, aki a kiralitás jelenségét elsőként borkősav kristályokat vizsgálva írta le[3].

A kiralitásnak négy fajtáját szokás megkülönböztetni:

- centrális kiralitás: az adott központi atomhoz (sztereogén centrum) – amely legtöbbször szén-, de lehet kén-, foszfor- vagy nitrogénatom is – kapcsolódó minden szubsztituens eltérő
- helikális kiralitás: különböző csavarmenetet képező molekulák (nukleinsavak, fehérjék) esetén figyelhető meg, az ellentétes menetű hélixek enantiomerjei egymásnak, kialakulásához nincs feltétlenül szükség sztereogén centrumra
- axiális kiralitás: a vegyület nem rendelkezik sztereogén centrummal, viszont van egy tengely, amely mentén a szubsztituensek úgy helyezkednek el, hogy az nem hozható fedésbe a tükörképével (pl.: allének)
- planáris kiralitás: a molekula nem egy síkban elhelyezkedő részeinek, egy adott síkhoz viszonyított helyzete adja meg[4].

Az egymással tükörképi viszonyban álló vegyületeket nevezzük enantiomereknek, míg az egymással fedésbe nem hozható, de nem tükörképi párokat alkotó vegyületek a diasztereomerek. Gyógyszervegyületek esetén szokás megkülönböztetni az eutomereket és a disztomereket. Az előbbi a kívánt hatást kiváltó enantiomer, míg az utóbbi lehet parciális agonista, hatástalan, esetenként toxikus is[5].

A királis vegyületek térszerkezetének leírására a konfigurációt és a konformációt használhatjuk. A konformáció az egymáshoz közvetlenül nem kapcsolódó atomcsoportok, míg a konfiguráció az egy adott atomhoz kapcsolódó többi atom térbeli helyzetét írja le. A konfiguráció leírására eleinte az Emil Fischer által javasolt *D* és *L* jelölést használták, aki a cukrok konfigurációját a *D*-gliceraldehidből vezette le, de mára általánosabbá vált a Cahn, Ingold és Prelog által bevezetett módszer (C. I. P. konvenció). Itt meghatározott szabályok szerint rangsorolják az adott központi atomhoz

kapcsolódó 4 szubsztituenst és megállapítják a körüljárási irányt. Amennyiben a körüljárás egyezik az óramutató járásával úgy a jelölés *R*, amennyiben pedig ellentétes úgy a jelölése *S*. Helikálisan királis molekuláknál aszerint, hogy a hélix jobbra vagy balra csavarodik a *P* (jobbmenetes) és az *M* (balmenetes) jelölés használatos[4].

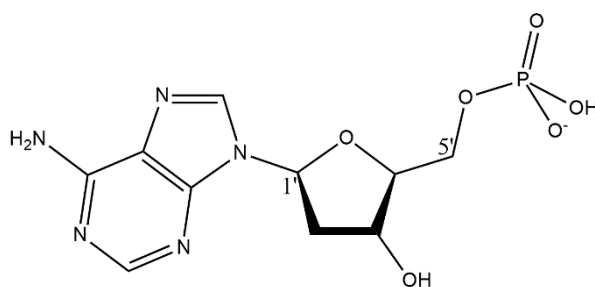
1.2. Makromolekulák

Makromolekulának nevezzük azokat a vegyületeket, amelyek kis molekulatömegű építőelem(ek) (monomer) ismétlődő egységeiből épülnek fel. Makromolekulák előfordulnak a természetben; ide tartoznak többek között a különböző nukleinsavak, peptidok és fehérjék valamint poliszacharidok, de szintén makromolekulának szokták nevezni a különböző műanyagokat, illetve makrociklusos vegyületeket, mint például a koronaétereket és a ciklodextrineket[4, 6].

1.2.1. A dezoxiribonukleinsav (DNS)

1.2.1.1. Szerkezet és típusok

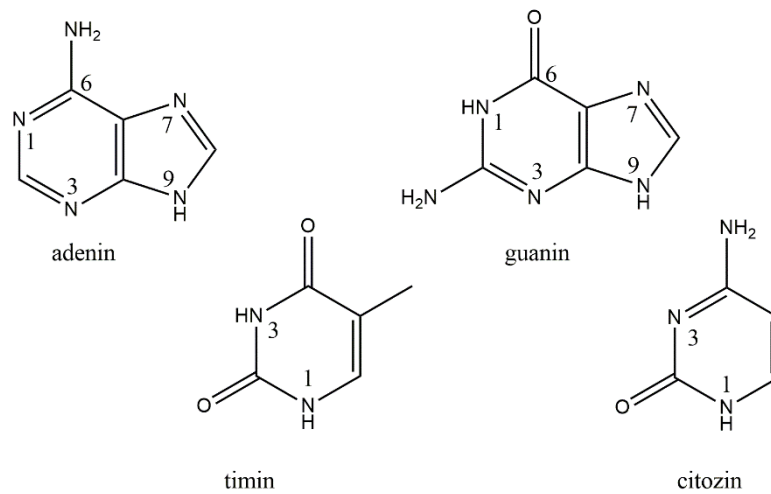
A DNS nukleotidokból felépülő polimer, amely a genetikai információt hordozza. Egy nukleotid három egységből épül fel: egy cukormolekulából, amely DNS esetén dezoxiribóz, ehhez 5'-ös pozícióban kapcsolódó 1-3 foszfát csoportból, valamint 1'-es pozícióban kapcsolódó nukleotid bázisból (1. ábra).



1. ábra: Az adenzin-monofoszfát (nukleotid alegység) szerkezeti képlete

DNS esetén a nukleotidok felépítésében 4 bázis vehet részt, a pirimidin alapvázal rendelkező timin (T) és citozin (C), valamint a purinvázal adenin (A) és guanin (G) (2. ábra). A polimer két antiparallel lefutású szálból épül fel, kettős hélix szerkezetet képezve, amelyet a nukleotid bázisok közötti intermolekuláris hidrogénkötések

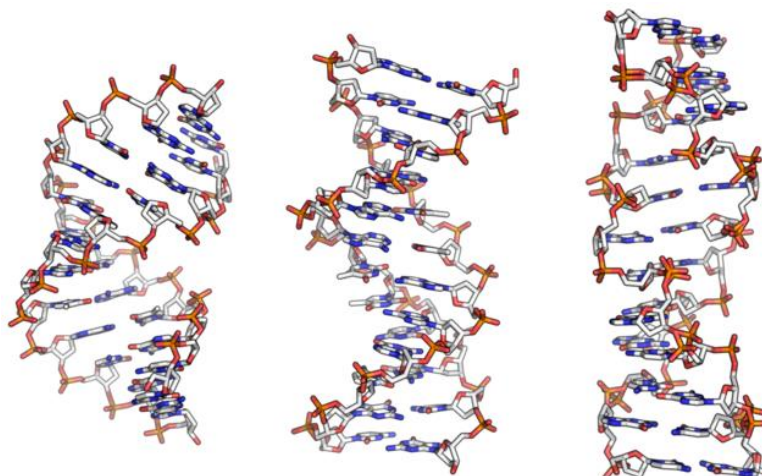
stabilizálnak. Igen jellemző elem a molekulában előforduló, a kettős hélix szerkezetből eredő kis- és nagyárok[7].



2. ábra: A DNS-ben előforduló nukleotid bázisok szerkezete

A DNS-nek mára a klasszikus szerkezetén túlmenően számos konformere ismert[8]. Ezek közül fontosabbak az A-, a B- és a Z-forma (3. ábra)[9]. Fiziológiai körülmények között a B-forma fordul elő, ez a „klasszikus” szerkezet, amelyet Watson és munkatársai leírtak. A hélix jobbmenetes, jellemző paraméterei, hogy egy csavarmenetet 10 bázispár alkot, melynek magassága 34 Å, a bázispárok által bezárt szög 36°[10], a cukorkomponens C2'-endo szerkezetű[11]. Az A-forma 75%-os nedvességtartalom alatt fordul elő. A B-DNS-hez hasonlóan szintén jobbmenetes hélixet képez, de a szerkezete tömörebb és rövidebb. Az egy csavarmenetre jutó bázispárok száma 11, míg magassága csupán 29 Å. Másik szerkezeti különbség, a dezoxiribóz C3'-endo konformációja[11]. A Z-DNS az előzőektől teljesen eltérő szerkezettel rendelkezik. A legszembevetőbb különbség, hogy a cukorfoszfát láncok balmenetű hélixet képeznek. Elsősorban olyan DNS szakaszoknál jelenik meg, amelyek alternáló purin-pirimidin szekvenciákat tartalmaznak[12]. Biológiai szerepet a szisztémás lupusz eritematózusban tulajdonítanak neki[13].

Külön említést érdemel a plazmid DNS. Ez a baktériumokban, akár több példányban is megtalálható extrakromoszomális, legtöbb esetben gyűrű alakú, kettős szálú DNS molekula, amely tovább feltekeredve szuperhélixet képez[14].

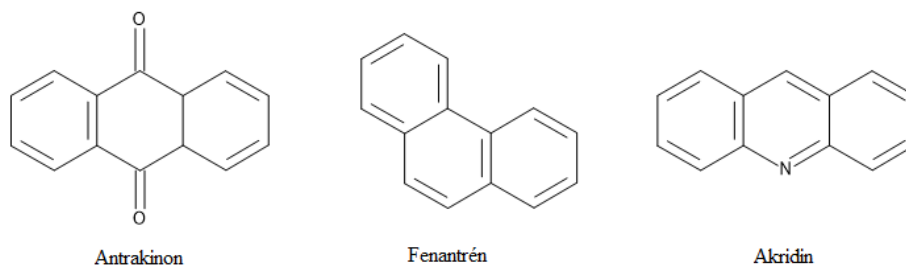


3. ábra: Az A- (bal), B- (középen) és a Z-DNS (jobb) szerkezete [9]

1.2.1.2. DNS-kölcsönhatások típusai

Sokféle vegyület, köztük gyógyszer ismert, amely valamilyen módon kötődik a DNS kettős spiráljához. Ezeket a kölcsönhatásokat két nagy csoportra lehet osztani, kovalens és nem-kovalens kötődésre. Utóbbin belül további csoportokat szoktak megkülönböztetni: interkalációt, kis- és nagyárok kötődést, külső kötődést[15]. A nem-kovalens kötések különféle kölcsönhatások eredményeként alakulnak ki, például hidrogénkötés, „ π - π stacking”, van der Waals erők[16].

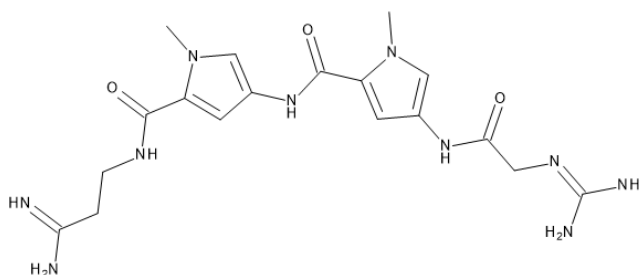
Interkaláció során a molekula a DNS bázispárjai közé ékelődik be, eredményként változnak a DNS helicitását jellemző paraméterek és a lánc meghosszabbodása figyelhető meg. Jellemző szerkezeti eleme az interkalátor vegyületeknek, a planáris bi/triciklusos (hetero)aromás gyűrűrendszer[17] (4. ábra).



4. ábra: Néhány DNS interkalációra képes vegyület alapvázának szerkezete

A kisárokba kötődő vegyületek esetében is felfedezhetők jellegzetes szerkezeti elemek. A molekulák több 5- vagy 6-tagú aromás gyűrűt tartalmaznak (pirrol, furán),

amelyek torziós szabadsággal rendelkező kötésekén keresztül kapcsolódnak, ezen felül rendelkezhetnek egyéb, hidrogénkötés kialakítására képes csoportokkal. A molekulák alakja félholdra hasonlít, így komplementer módon tudnak beilleszkedni a kötőhelyre (5. ábra). A vegyületek elsősorban AT gazdag DNS régiókhoz kapcsolódnak, így előnyösebb kölcsönhatásokat képesek kialakítani, illetve a G C2-es helyzetben lévő amino-csoportja sztérikusan gátolhatja a kötődést[18, 19].



5. ábra: Egy kisárokba kötődő vegyület (netropszin) szerkezete

1.2.1.3. DNS-en ható gyógyszermolekulák

A ma használt gyógyszerkincsben számos molekula van, amely a DNS-sel valamilyen kölcsönhatásba lépve fejt ki a hatását. Terápiában ezeket a citotoxikus szereket jelenleg a különféle daganatok kezelésére használják. Alkalmazásuk legnagyobb hátránya, hogy a gyógyszermolekula nem tud különbséget tenni az egészséges emberi és a tumor sejt között, ennek következményeként gyakran súlyos mellékhatásokat okoznak.

A citotoxikus szerek hatásukat igen sokféle módon fejtik ki. Hatásmód alapján az alábbiak szerint csoportosíthatóak:

- nukleinsav és folsav szintézis gátlása – antimetabolitok
- nukleinsav működésének gátlása – alkilezőszerek, komplexképzők
- proliferáció gátlása (mikrotubulusokra ható szerek) – komplexképzők[20].

Az antimetabolitok szerkezete nagyban hasonlít a normál anyagcsere során keletkező metabolitokéra, hatásukat a sejtanyagcsere főbb lépéseinek gátlásával fejtik ki, ezáltal befolyásolják a sejtosztódást. Két fő támadáspontjuk a folsav, valamint a nukleinsav szintézis gátlása (folsav szintézis gátlása – metotrexát, nukleinsav szintézis gátlása – 5-fluorouracil, 6-merkaptopurin).

Az alkilezőszerek kovalens kötésekét alakítanak ki a DNS-ben. Megkülönböztetünk monofunkcionális és bifunkcionális alkilezőszereket, előbbi csoport

egy, utóbbi két kovalens kötés kialakítására képes. Ez a kötés létrejöhet a DNS-szálon belül vagy szálak között (keresztkötések). Ennek következtében a nukleinsav szerkezete károsodást szenved és gátolt lesz a további sejtosztódás. Szerkezetileg az alkilezőszerek igen sokfélék lehetnek, ide tartoznak többek között a mustárnitrogének (ciklofoszfamid), nitrózurea-származékok (karmustin), valamint különböző platinavegyületek (ciszpaltin).

A komplexképző vegyületek kétféle mechanizmussal fejthetik ki a sejtproliferáció gátlást. A vegyületek egy része, akárcsak az alkilezőszerek, a DNS-sel alakít ki kölcsönhatást, azonban az előző csoporttal ellentétben nem-kovalens kötések létrehozása révén fejt ki a hatását (polifunkciós antibiotikumok). A vegyületek másik része a mitotikus orsóra hat: a *Vinca* alkaloidok gátolják a mitotikus orsót felépítő tubulin polimerizációját, a taxánok ezzel ellentétesen hatva az orsó lebomlását akadályozzák meg[21].

1.2.1.4. Genotoxicitás

Genotoxicitásról beszélünk, ha valamilyen behatás következtében a genetikai örökítőanyag károsodást szenved. Ennek eredményeként szerkezeti módosulások jönnek létre a DNS szerkezetében, megváltozik vagy átrendeződik a genetikai állomány, amely különféle mutációkat indukálhat.[22]. Többféle ágens károsíthatja a DNS szerkezetét, ezek lehetnek endogén vagy exogén anyagok, illetve fizikai (UV fény, radioaktív sugárzások) vagy kémiai (reaktív oxigén szabadgyök (ROS), interkalátorok) ágensek[23].

Kémiai vegyületeknél bizonyos szerkezeti elemek megléte feltételezi, hogy potenciálisan genotoxikus hatásúak[24]:

- aril-amin vagy aril-nitro funkció
- epoxidos gyűrű
- alkánszulfonsav-észterek
- azo-csoport
- gyűrűs N-oxid
- N(CH₃)₂-csoport
- aziridin-csoport
- nitrogénmustárok
- klóraminok
- alkil-nitrózaminok és alkil-uretánok

- benzil-haloidok
- alifás aldehid-csoport.

A DNS-károsodásnak több típusát szokták megkülönböztetni. Depurinizáció során a purin bázis és a dezoxiribóz molekula közötti kötés hidrolizál[25]. Dezaminálás során – amely spontán is megtörténhet, de a ROS-ok felerősítik a folyamatot – az A, T vagy C bázisok elveszítenek egy aminocsoportot[26]. ROS-ok hatására különböző oxidációs folyamatok zajlanak le a láncon, mint például a T, timin-glikollá történő oxidációja. Ez a folyamat a DNS-polimeráz működését gátolja[27, 28]. Metilezés vagy alkilálás során a bázisok nitrogén vagy oxigén atomjaira kerül egy metil-, illetve egy alkilcsoport, melynek következményeként a replikáció során a komplementer DNS-szála másik bázis épülhet be (pl.: O⁶-metilguaninnal szemben T)[29]. Szintén DNS-károsodást okoznak a különböző kovalens keresztkötések. A keresztkötés létrejöhet DNS-szálon belül, illetve szálak között, de kialakulhat DNS és fehérjék között is[30].

Humán alkalmazásra szánt gyógyszerkészítmények esetén a gyógyszerkutatás korai fázisában végzik a toxikológiai vizsgálatokat[31]. Mind az Európai mind az Amerikai Gyógyszerkönyv egy háromlépcsős genotoxicitási vizsgálatot alkalmaz az esetleges DNS károsodás kimutatására. Ennek első lépésjeként a vizsgálatot baktériumokon végzik (*Ames*-teszt), ezután emlős sejteken *in vitro* vizsgálják a kromoszómakárosodást vagy egér limfóma timidin-kináz génmutációs próbát végeznek. Az utolsó lépésben *in vivo* kísérletekkel vizsgálják a kromoszómakárosodást rágszálók hematopoetikus sejtjeit felhasználva (mikronukleusz vagy kromoszóma aberrációs teszt)[32].

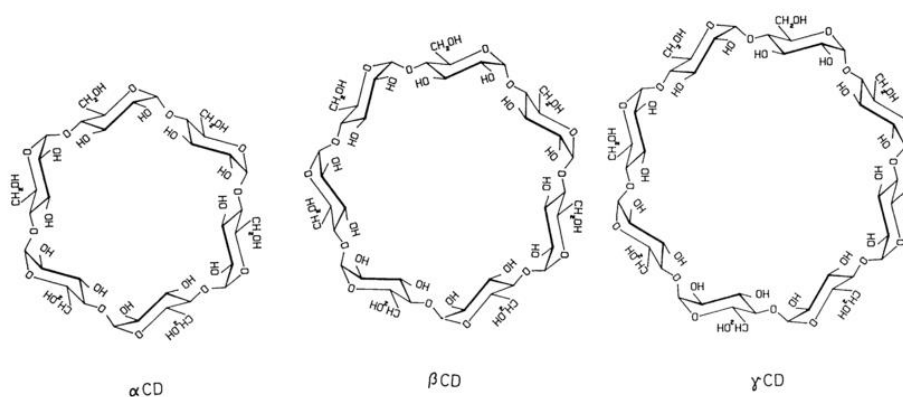
1.2.2. Ciklodextrinek (CyD-ek)

1.2.2.1. Szerkezet és típusok

A CyD-ek α -D-glükopiranoz egységekből felépülő makrociklusos oligoszacharidok, amelyben a monomer egységek α -(1,4) kötéssel kapcsolódnak egymáshoz. Előállításuk keményítőből történik, bakteriális (pl.: *Bacillus macerans*, *Klebsiella oxytoca*) ciklodextrin-glikozil-transzferáz enzim felhasználásával[33]. A glükopiranoz egységek ⁴C₁ szék konformációjának eredményeképpen, a molekulák szerkezete egy csonkakúphoz hasonlít. A monomerek szekunder alkoholos hidroxil-csoportjai (C₂, C₃) a kúp szélesebb, míg a primer alkoholos hidroxil-csoportok (C₆) a

szűkebb oldalán találhatóak; a C3-as és C5-ös hidrogének, valamint az éteres oxigének pedig a belső üregben helyezkednek el. Ennek következtében az oligoszacharid egy hidrofil külső felszínnel és egy hidrofób üreggel rendelkezik[34].

A három alapvető természetes (natív) CyD 6, 7, illetve 8 glükopiranoz egységből épül fel, ezek az α -, β -, valamint γ -ciklodextrinek (ACyD, BCyD, GCyD) (6. ábra). Ezek a vegyületek több fizikai-kémiai tulajdonságban is eltérnek egymástól (1. táblázat)[35].



6. ábra: A natív CyD-ek szerkezete[36]

1. táblázat: Natív CyD-ek fizikai tulajdonságai

	ACyD	BCyD	GCyD
monomerek száma	6	7	8
molekulatömeg	972	1135	1297
vízoldhatóság (g/100 ml, 25°C)	14,5	1,85	23,2

A táblázatból látható, hogy a natív CyD-ek közül a BCyD igen rossz vízoldhatósággal rendelkezik. Ennek kiküszöbölésére kezdtek el különböző származékokat szintetizálni. A hidroxil-csoportok szubsztituálásával (lipofil csoportok esetén is) az oldhatóság bizonyos szubsztituáltsági fokig növekszik, azonban az összes csoport szubsztituálása esetén ismét lecsökken. A szubsztituáltsági fok mutatja meg számunkra, hogy egy glükóz molekulán mennyi szubsztituens található. A megnövekedett oldhatóság magyarázata, hogy a származékképzés hatására a kristályos A-, B-, és GCyD átalakul különböző izomerek amorf formáinak keverékévé[37].

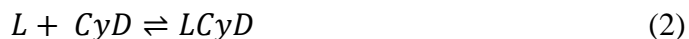
1.2.2.2. Komplexképzés

A CyD-ek legfontosabb tulajdonsága, hogy különféle molekulákkal képesek zárványkomplexeket képezni. A CyD-ek vizes oldatában, a belső üregben vízmolekulák helyezkednek el, amely egy energetikailag kedvezőtlen állapot, így könnyen kicserélhetőek más, a víznél kevésbé poláris molekulákra. Ennek során a rendszer szabadentalpiája (H) csökken, a vízmolekulák szabadabbá válása következtében pedig nő a rendszer entrópiája (S). A termodinamika második főtételének értelmében ez a folyamat spontán végbemegy, hogyha:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \leq 0 \quad (1)$$

ahol ΔG a szabadenergia, T pedig az abszolút hőmérséklet.

A folyamat során az esetek nagy részében 1:1 arányú komplex képződik, de lehetséges 2:1, 1:2 és 2:2 arányú vagy ennél akár bonyolultabb összetételű komplexek létrejötte. A komplexképződést a megfelelő állandóval lehet jellemezni. 1:1 arányú komplex képződését az alábbi egyensúlyi egyenlettel tudjuk leírni:



amelyre felírható a komplex stabilitására jellemző K egyensúlyi állandó:

$$K_{stab} = \frac{[LCyD]}{[L][CyD]} \quad (3)$$

amelyben $[L]$ a komplexálódó „vendégmolekula”, $[CyD]$ az alkalmazott CyD, $[LCyD]$ pedig a képződött komplex egyensúlyi koncentrációja[35]. A létrejött komplexben új kötések nem alakulnak ki, a szerkezetet nem-kovalens kölcsönhatások, mint pl.: ionos kötés, hidrogénkötés, van der Waals erők stabilizálják.

A vendégmolekula felszabadulása a CyD komplexekből különböző mechanizmusokkal történhet. Parenterális vagy orális alkalmazás esetében a komplexből való felszabadulás leggyakrabban a hígulás miatt következik be. Ezen kívül szerepet játszhat, hogy a vendég gyógyszermolekulát más ligandum kompetitíven kiszorítja a CyD üregéből, illetve, hogy a komplex molekula nem tud fehérjékhez kötődni vagy a

szövetekbe bekerülni. Stabilabb komplexek esetén a CyD eliminációja szintén segíti a gyors és kvantitatív disszociációt[38].

1.2.2.3. Analitikai felhasználás

A CyD-eket az analitikai kémiában elsősorban különböző elválasztástechnikai módszerek során használják fel királis vegyületek elválasztására. Alkalmazzák őket gázkromatográfia (GC), nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) és kapilláris elektroforézis (CE) során is, mint királis szelektorokat. Mindhárom eljárásnál lehet őket királis állófázisként alkalmazni, ahol a CyD-ek kovalensen vannak kötve a hordozóhoz, CE és HPLC analízis során pedig lehetőség van a mozgófázisban feloldva királis szelektorként használni őket[39–42].

1.2.2.4. Gyógyszerészeti vonatkozások

A CyD-eket a gyógyszeripar elsősorban a komplexképző sajátossága miatt alkalmazza segédanyagként. Legfőbb felhasználási területük az oldékonyságnövelés, amellyel a biofarmáciai osztályozási rendszer (BCS) besorolás szerinti II. és IV. osztályba tartozó, vagyis rossz vízoldhatósággal rendelkező gyógyszerek biohasznosíthatóságát tudják javítani (2. táblázat)[43].

2. táblázat: A gyógyszerek BCS besorolása[44]

Osztály	Oldhatóság	Permeabilitás
I.	jó	jó
II.	rossz	jó
III.	jó	rossz
IV.	rossz	rossz

A CyD-ek megnövelik a gyógyszermolekulák fizikai, kémiai és termális stabilitását, ezáltal megvédik a levegő oxigén- és nedvességtartalmától, fény- és hőhatásoktól, valamint a mikroorganizmusok általi lebontástól. Alkalmazhatóak még kellemetlen íz vagy szag, illetve pigmentek és szín maszkírozására is, könnyítik a szobahőmérsékleten folyékony vagy olajos anyagok formulálását, mert a komplexképzés révén kristályos vagy amorf porokat képeznek, amelyekből egyszerűbb a szilárd gyógyszerforma előállítás. Ezen tulajdonságai miatt, a gyógyszeriparon kívül a

kozmetikai ipar, a mezőgazdaság és az élelmiszeripar is előszeretettel alkalmazza a CyD-eket[34, 45].

Az Európai és az Amerikai Gyógyszerkönyvekben a három natív CyD, valamint két szintetikus származék, a hidroxipropil- β -ciklodextrin (HPBCyD) és a szulfobutiléter- β -ciklodextrin (SBBCyD) hivatalos. Segédanyagként ezeken kívül a hidroxipropil- γ -ciklodextrint és a random-metil- β -ciklodextrint (RMBCyD) lehet használni humán alkalmazásra szánt készítményeknél[46]. Egy módosított GCyD származék forgalomban van gyógyszerként (Bridion®) és neuromuszkuláris blokkolók (rokurónium, vekurónium) hatásának felfüggesztésére alkalmazzák[47], a HPBCyD pedig „*orphan drug*”-nak lett minősítve a C-típusú Niemann-Pick-szindróma – egy, a lipid anyagcserét érintő metabolikus zavar – kezeléséhez kapcsolódóan[48].

Segédanyagként igen sokféle gyógyszerformában alkalmazhatóak ezek a vegyületek. A 3. táblázat tartalmazza, hogy mely CyD-ek milyen gyógyszerformában vannak engedélyezve az Európai Gyógyszerügynökség által[49], valamint 1-1 példa, hogy milyen hatóanyagok vannak forgalomban az adott CyD komplexeként[50]. Ugyanakkor a CyD-ek nem várt farmakokinetikai anomáliát is okozhatnak, amennyiben egy racém hatóanyagnál alkalmazzák segédanyagként, mivel a kioldódás és a felszívódás során enantiomer túlsúlyt alakíthatnak ki[51, 52].

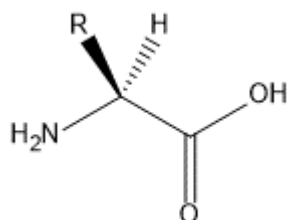
3. táblázat: Különböző gyógyszerformákban segédanyagként alkalmazott CyD-ek listája

	ACyD	BCyD	GCyD	HPBCyD	SBBCyD	RMBCyD
orális		+ nimeszuli d	+	+ perindopri l	+ ziprazido n	
nazális						+ ösztradiol
rektális		+ piroxikám		+ cizaprid		
dermális		+ dexa- metazon	+ minoxi- díl	+		
okuláris		+ tiomerzál		+ indome- tacin		+ klóramfeni- kol
parenterális	+ alproszta- díl			+ ittrakonazo- l	+ vorikonazo- zol	

1.2.3. Fehérjék

1.2.3.1. Szerkezet és felépítés

A fehérjék aminosav monomerekből felépülő makromolekulák. A természetben közel 500 aminosav fordul elő, de ezek közül mindössze 20 vesz részt a fehérjék felépítésében (ún. proteinogén aminosavak)[53]. Az aminosavak jellemző szerkezeti elemei a névből következően, az amino- (-NH₂), valamint a karboxil-csoport (-COOH), ezen felül a fehérjeépítő aminosavakra még jellemző, hogy a két funkciós csoport ugyanahhoz a szénatomhoz kapcsolódik (α -aminosavak) (7. ábra). A proteinogén aminosavak a glicin kivételével mind homokirális (L) kémiai entitások.



7. ábra: Az α -aminosavak általános szerkezeti képlete

A fehérjék térszerkezetét több szinten szokás leírni. Az elsődleges szerkezetet az aminosavak kapcsolódási sorrendje határozza meg, amelyet a DNS kódol. A másodlagos

szerkezet a fehérjén belüli lokálisan rendezett struktúrák leírására szolgál. Jellegzetes előforduló szerkezeti elemek az α -hélix, a β -redő és a β -kanyar, illetve ezek módosulatai. A harmadlagos szerkezet a fehérjék háromdimenziós térszerkezetét írja le, amelyet hidrogén- és ionos kötések, illetve diszulfid-hidak stabilizálnak. A negyedleges szerkezet pedig a fehérjét alkotó alegységek térszerkezetét adja meg[54].

1.2.3.2. Gyógyszerészeti vonatkozások

A fehérjéket, valamint peptideket alkalmazzák különféle betegségek terápiájában. Ide tartoznak az enzimhiányos állapotok kezelésében használatos fehérjék, a hemofiliák esetében alkalmazott véralvadási faktorok, illetve a különféle antitestek, amelyeket daganatok, gyulladásos betegségek, stb. terápiájában használnak[55].

1.3. Gyógyszer-makromolekula kölcsönhatások vizsgálatára alkalmazott műszeres módszerek

Gyógyszer-makromolekula oldatfázisú kölcsönhatások vizsgálatára igen sokféle módszer áll rendelkezésre. Az alkalmazható technikák között előfordul többfajta spektroszkópai módszer, mint például az UV/VIS spektroszkópia (ultraibolya/látható spektroszkópia), kiroptikai spektroszkópia, mágneses magrezonancia (NMR) spektroszkópia, illetve fluoreszcens módszerek. Ezen felül gyakran alkalmaznak elválasztástechnikai módszereket, a két molekula kölcsönhatásán alapul többek között a királis elválasztás, mind HPLC, mind CE során. Biomakromolekula-kismolekula kölcsönhatások vizsgálata során pedig lehetőség van különféle biokémiai módszerek alkalmazására is (pl.: „*footprinting*”). Szilárdfázisú módszerek közül elsődlegesen a röntgen diffrakció, valamint az infravörös és a Raman-spektroszkópia alkalmazása jöhet szóba.

1.3.1. Kiroptikai spektroszkópia

A kiroptikai spektroszkópai módszerek a fény és a közeg kölcsönhatásai alapján két nagy csoportra oszthatók: a cirkuláris dikroizmus (CD) és az optikai rotációs diszperzió (ORD) spektroszkópiára.

1.3.1.1. Optikai rotációs diszperzió (ORD)

Az optikai rotációs diszperzió (ORD) mérés elve, hogy a fény sebessége közeghatárokon áthaladva változást szenved. Királis molekulák esetében a törésmutató eltérő lesz a jobbra és a balra cirkulárisan polarizált fényre nézve. Ennek eredőjeként a minta a polarizált fény síkját egy adott α szöggel el fogja forgatni, ezt a szöget ábrázolva a hullámhossz függvényében kaphatjuk meg a vegyületre jellemző ORD spektrumot.

1.3.1.2. Cirkuláris dikroizmus (CD)

Egy lineárisan polarizált fénynyaláb felbontható két, egymással ellentétes irányú cirkulárisan polarizált komponensre, illetve két ellentétes irányban cirkulárisan polarizált fény eredőjeként síkban polarizált fényt kapunk. Akirális, kromofór csoportot tartalmazó közegben a két cirkulárisan polarizált fény abszorbanciája egyenlő lesz, királis- vagy királisán perturbált kromofórt tartalmazó közegben viszont a fényelnyelés eltérő a két komponensre nézve. Ennek eredményeként a cirkulárisan polarizált komponensek eredő vektora egy elliptikus pályán fog mozogni. Az ellipszis kis- és nagytengelye által bezárt szög az ellipticitás (ψ). Az ellipticitáshoz kapcsolódóan vezették be a specifikus ($[\psi]$) és a moláris ellipticitás ($[\Theta]$) fogalmát (4. és 5. egyenlet).

$$[\psi] = \frac{100\psi}{c_p l} \quad (4)$$

$$[\Theta] = \frac{[\psi]M}{100} = 3300\Delta\varepsilon \quad (5)$$

M jelöli a molekulatömeget, c_p a koncentrációt g/100 ml egységben kifejezve, l pedig a fényúthosszt dm-ben megadva[56].

A cirkuláris dikroizmus ($\Delta\varepsilon$) az ellipticitással arányos mennyiség, amely a balra (ε_L) és a jobbra cirkulárisan polarizált (ε_R) fénykomponensre vonatkoztatott elnyelés különbségéből származtatható (6. egyenlet). A CD készülékek általában ezt az abszorpciókülönbséget mérik és nem közvetlenül az ellipticitást[57].

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R \quad (6)$$

Miután CD mérések során fényabszorpció mérése történik, ezért jelet csak olyan esetben kapunk, ha a vizsgált vegyületünk önmagában királis kromofór, vagy a kromofór csoport elektron átmenete a királis környezet miatt zavart. A CD sávok a molekula abszorpciós hullámhossztartományában jelennek meg.

A CD jel kialakulásának kvantumfizikai feltétele, hogy az adott elektronátmenet rotátorerőssége (R) ne legyen 0. Ezt az adott átmenethez tartozó elektromos (μ) és mágneses átmeneti momentumokból (m) lehet számolni a 7. egyenlet alapján. Amennyiben $R > 0$ akkor pozitív, ha viszont $R < 0$, akkor negatív Cotton-effektusról beszélünk.

$$R = \mu m = |\mu||m|\cos\varphi \quad (7)$$

Az egyenletben a $\cos\varphi$ a két vektor által bezárt szög koszinuszát jelenti. Ebből az egyenletből következik, hogy a Cotton-effektus kialakulásához mindkét momentum értékének 0-tól különbözőnek kell lennie. Kizárólag ebben az esetben történhet helikális elektronátmenet, amely következtében a vizsgált komponens elnyelése eltérő lesz a két cirkulárisan polarizált fénykomponensre nézve. Előfordulhat, hogy bár van az átmenethez tartozó elektromos és mágneses átmeneti momentum is, azonban ez a két vektor merőleges egymásra, ezáltal a rotátorerősség értéke 0 lesz ($\cos 90^\circ = 0$) és nem detektálunk CD jelet.

1.3.1.3. Az indukált cirkuláris dikroizmus (ICD)

Indukált cirkuláris dikroizmus (ICD) jelről abban az esetben beszélünk, amikor egy önmagában nem királis, de kromofór csoporttal rendelkező molekula királis környezetbe kerül. Ennek egyik válfaja az exciton csatolt kiralitás vagy exciton csatolt cirkuláris dikroizmus (ECCD). Ennél a jelenségnél két kromofór olyan közel kerül egymáshoz a térben, hogy a gerjesztett állapotaik kölcsönhatásba lépnek egymással, és ez a CD spektrumban két ellentétes előjelű sáv megjelenését eredményezi („*couplet*”). Az ECCD módszert az abszolút konfiguráció meghatározására használják[58]. A másik nagy csoportot az ún. gazda- és vendégmolekula kölcsönhatások („*host-guest interactions*”) alkotják.

Nem királis vendégmolekulák esetében a megjelenő ICD jel a vendégmolekula abszorpciós tartományában jelenik meg és az előjele lehet pozitív vagy negatív. ICD jel esetén a rotátorerősséget az alábbi tényezők befolyásolják (8. egyenlet).

$$R \propto D \Sigma \frac{\mu_i^2 G F_i}{\Delta_i} \quad (8)$$

Az egyenletben D a vendégmolekula elektronátmenetének dipólus erőssége, μ_i a gazdamolekula elektronátmenetei, $G F_i$ a vendég- és a gazdamolekula átmeneti momentumainak geometriai elrendeződése, Δ_i pedig a vendég- és a gazdamolekula elektronátmeneti gyakorisága közti különbséghez kapcsolódó mennyiségi paraméter[59, 60].

1.3.1.4. A DNS CD spektroszkópiája

A DNS kiralitása 3 tényezőre vezethető vissza:

- a cukorkomponens kiralitására, amelynek következtében a nukleotidok önmagukban is szolgáltatnak CD jelet,
- a helicitásra,
- bizonyos környezetben megjelenő harmadlagos szerkezeti struktúrákra, mint a triplexek, kvadruplexek, stb.

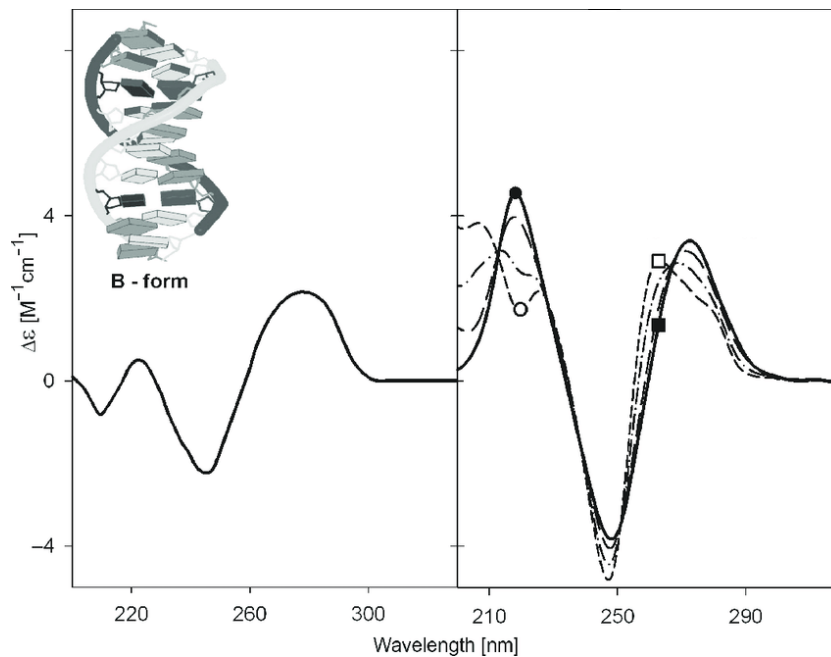
A spektrum kialakulásában elsődlegesen a helikális elrendezésű bázispárok játszanak szerepet[61].

A DNS CD spektroszkópiájában a 180-300 nm hullámhossz közötti tartományt alkalmazzák leggyakrabban, mert itt van a bázispároknak is elnyelése. A 200 nm alatti vizsgálatokhoz már speciális körülményekre van szükség, mivel itt már a levegő egyes komponenseinek is van abszorpciója, továbbá a nagyenergiájú sugárzás hatására az oxigénből ózon keletkezhet, amely mind a műszerre, mind pedig a mérést végző személyre nézve káros. Ezen kívül lehetőség van méréseket végezni a távoli UV, illetve az infravörös tartományban is. A DNS CD spektrumának kvantumkémiai leírása nagyon komplex, így nem képes atomi szintű szerkezeti információt adni a molekuláról. Ennek következtében a DNS CD spektroszkópiája elsődlegesen empirikus alapokon nyugszik, viszont számos előnye van a többi szerkezetvizsgáló módszerrel összevetve. A módszer igen érzékeny, így alacsony koncentrációjú oldatokkal lehet dolgozni, emellett gyors és

olcsó, valamint egyszerű lehetőség adódik titrálások kivitelezésére, ezáltal pedig a változások spektrális monitorozására[62].

A DNS mindhárom formája jellegzetes CD spektrummal rendelkezik, és ezek a környezet bizonyos tényezőinek megváltozására képesek egymásba átalakulni. E mellett tanulmányozhatók speciálisabb szerkezetek is, mint például C vagy G kvadruplek, illetve az úgynevezett kondenzált DNS (psi DNS)[63, 64].

A DNS leggyakrabban B konformációt vesz fel, az emberi szervezetben is ebben a formában van jelen. Spektrumára jellemző a 260-280 nm-es tartományban lévő pozitív, valamint a 230-260 nm-es tartományban megjelenő negatív sáv (8. ábra). Az előbb említett pozitív sáv a bázispárok π - π kölcsönhatásának az eredménye, míg a negatív sáv a molekula helicitása következtében jelenik meg[65].



8. ábra: A B-DNS CD spektruma[61]

A B-DNS (alacsony ionerősségű) oldatához etanolt adva átalakul A konformációjúvá. Ez a változás gyors és reverzibilis. Az A forma spektrumának jellemzői egy intenzívebb pozitív sáv 260 nm körül, valamint egy nagyobb intenzitású negatív sáv 210 nm környékén. Léteznek olyan szekvenciák, amelyek nem képesek A konformációt kialakítani, például a poli[d(A)]•poli[d(T)] is ezek közé tartozik[66].

Azt, hogy a DNS-nek létezik Z konformációja, CD spektroszkópiás eredmények alapján igazolták[67]. Itt a hélix balmenetes, így a spektruma szinte teljesen ellentétes a B-DNS-ével. A spektrumban 290 nm-nél egy negatív, 260 nm-nél pedig egy pozitív sáv található, valamint tartalmaz egy igen karakterisztikus negatív sávot az alacsony, ~205 nm körüli hullámhossznál. A B-Z átalakulás végbemehet például trifluoretanolban, azonban ez időt vesz igénybe[66].

1.3.1.5. A fehérjék CD spektroszkópiája

A CD spektroszkópia legrégebben és leggyakrabban alkalmazott felhasználása a fehérjék szerkezetének felderítése és a szerkezeti változások követése. A 180-260 nm-es hullámhossz tartományt a másodlagos szerkezeti elemek meghatározásához lehet használni, itt van elnyelése a fehérjékben található peptidkötéseknek. A 250-320 nm közötti tartomány abszorpciója az aromás aminosavakra, a triptofánra, a tirozinra és a fenilalaninra vezethető vissza, ez a tartomány inkább a harmadlagos és negyedleges szerkezetről szolgáltat információ[68].

A fehérjékben előforduló α -hélix spektruma három jellegzetes sávval rendelkezik 180 nm felett. A 222 nm-nél megjelenő negatív sáv a peptidkötés $n-\pi^*$ átmenetének, a 207 nm körüli negatív és a 190 nm körüli pozitív sávok pedig a $\pi-\pi^*$ átmeneti momentumnak és exciton csatolásának a következménye[69]. A β -redőre jellemző egy negatív sáv 216 nm környékén, amely az $n-\pi^*$ átmenet következtében jön létre, ezen kívül a $\pi-\pi^*$ exciton csatolás miatt megjelenik egy pozitív sáv 196 nm-nél, illetve egy negatív sáv 169 nm-nél[70]. A rendezetlen struktúrák legjellemzőbb CD jele egy intenzív negatív sáv 197 nm környékén és egy igen gyenge pozitív sáv 217 nm-nél ($n-\pi^*$ átmenet)[71].

A másodlagos szerkezet felderítésének alapja az a feltevés, hogy a kapott CD spektrum a másodlagos szerkezeti elemek lineáris kombinációjából tevődik össze, valamint, hogy a hozzájárulások additívak (9. egyenlet).

$$C_{\lambda} = \sum_{i} f_i B_{i\lambda} \quad (9)$$

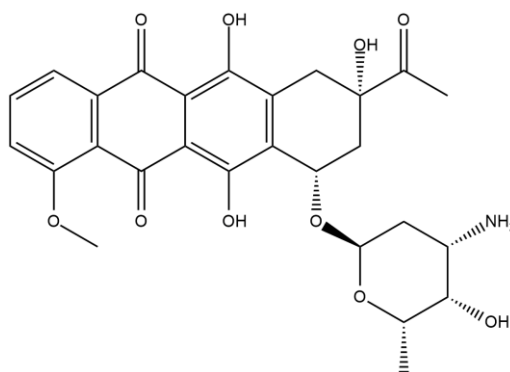
Az egyenletben C_{λ} jelöli az adott λ hullámhosszon detektált CD jelet, f_i az i -edik másodlagos szerkezeti elem frakcióját, $B_{i\lambda}$ pedig az i -edik másodlagos szerkezetre jellemző CD jelet λ hullámhossznál.

1.3.1.6. A DNS-gyógyszer kölcsönhatások CD spektroszkópiája

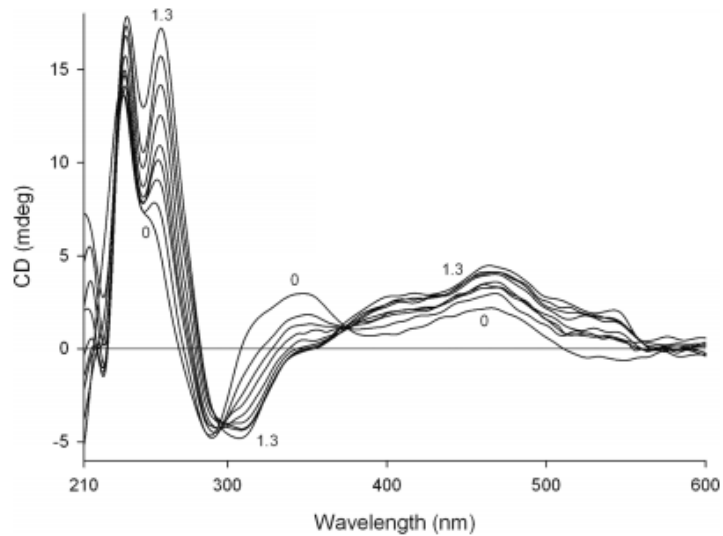
Mint az 1.2.1.2 fejezetben említésre került, a kismolekulák többféle módon képesek kötődni a DNS-hez. A különböző kötődési módok eltérő, de jellemző változásokat eredményeznek a DNS CD spektrumában.

Az interkaláció elméletét először 1961-ben Lerman vetette fel[72], majd ezt 1966-ban Pritchard és munkatársai továbbfejlesztették. Feltételezésük szerint a több aromás vagy heteroaromás gyűrűvel rendelkező vegyületek képesek beépülni a DNS bázispárjai közé, amit a hidrogénkötések és a π - π kölcsönhatások stabilizálnak[73].

Interkaláció esetén az ICD jel általában alacsony intenzitással rendelkezik, előjele lehet pozitív és negatív is annak függvényében, hogy az interkaláló vegyület hosszú tengelyének az elektronátmeneti momentuma merőleges vagy párhuzamos a DNS helikális tengelyével. Interkalációra képes vegyületek például a különböző antraciklinek, amelyek közül a daunorubicin (9. ábra) enantioszelektív kötődést mutat. A (+)-daunorubicin a B-konformációjú DNS-hez, míg enantiomerje, a (-)-daunorubicin a Z-DNS-hez kötődik[74]. A 10. ábrán látható az interkalátorokra jellemző ICD jel.

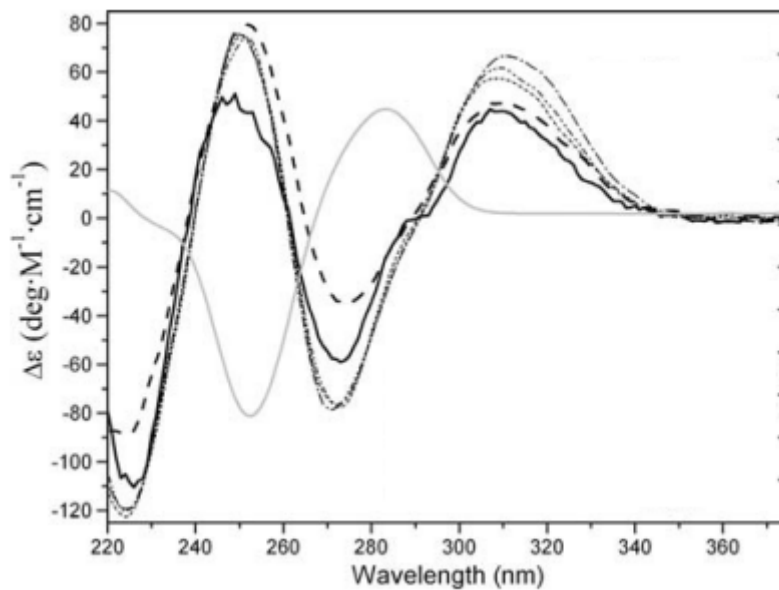


9. ábra: A daunorubicin szerkezete



10. ábra: Az interkalátorokra jellemző ICD jel[75]

Kisárokba kötődő vegyületek esetén a jellemző spektrális változásokat legjobban a netropszin (1.2.1.2. fejezet, 5. ábra) DNS-kötődésén keresztül lehet bemutatni. A vegyület a kisárokban egy AATT szekvenciához kötődik, amelyet egyrészt van der Waals és hidrogénkötések stabilizálnak, másrészt a fiziológias pH-n protonált nitrogén következtében elektrosztatikus kölcsönhatás is létrejön. Az interkalátorokkal összevetve az ICD jel intenzitása számottevően nagyobb[76] (11. ábra).



11. ábra: A kisárok kötődésre jellemző ICD jel[77]

1.3.1.7. CyD komplexek CD spektroszkópiája

A CyD-ek bár királis molekulák, kromofór csoport hiányában nem adnak CD jelet. Amennyiben egy akirális, kromofór csoportot tartalmazó molekulával – amely önmagában szintén nem rendelkezik CD jellel – kölcsönhatást hoznak létre, úgy a vendégmolekula kromofórja királisan perturbálttá válik és megjelenik az ICD jel, amely jellemző és szelektív a komplexre. Királis kromofórt tartalmazó vendégmolekula esetén a különbségi spektrumok elemzése nyújt információt a kölcsönhatás létrejöttéről.

A Kodaka-Harata szabályok információt szolgáltatnak a vendégmolekula helyzetéről a komplexben az ICD jel előjele alapján. Ha a vendégmolekula az üregben található, és átmeneti dipólusmomentuma paralel a CyD szimmetriatengelyével, a komplexképződéskor fellépő Cotton-effektus pozitív; amennyiben merőlegesek egymásra, a Cotton-effektus előjele negatív és nagysága csupán feleakkora a pozitív Cotton-effektuséhoz képest. Ha a vendégmolekula a CyD üregén kívül helyezkedik el, a fellépő effektusok nagysága és előjele éppen fordított. Tehát a detektált jel előjele a vendégmolekula orientációjáról ad információt, intenzitása pedig arról, hogy milyen mértékben merül bele a vendégmolekula a CyD üregébe[78, 79].

1.3.1.8. A fehérje-gyógyszer kölcsönhatások CD spektroszkópiája

Az emberi szervezetben a gyógyszermolekulák a véráramban képesek a plazmafehérjékhez kötődni. A két legjelentősebb plazmafehérje az albumin (HSA) és az α_1 -glikoprotein (AGP). A HSA két kötőhellyel („*site I*” és „*site II*”) rendelkezik. A gyógyszerek között előfordulnak olyanok, amelyek szelektíven csak az egyik kötőhelyre kapcsolódnak, pl.: *site I* kötőhelyre kapcsolódik a warfarin[80], *site II*-re pedig az 1,4-benzodiazepinek[81]. A CD spektroszkópia lehetőséget nyújt, hogy vizsgálni tudjuk a különböző gyógyszermolekulák fehérjekötődését az ICD jelet felhasználva, amennyiben az a fehérje abszorpciós tartományán kívül (250-300 nm felett) jelentkezik, valamint lehetőség van a kötődési állandó meghatározására is[82, 83].

1.3.2. Egyéb spektroszkópiai módszerek

1.3.2.1. UV/VIS spektroszkópia

A CD spektroszkópiához hasonlóan az UV/VIS spektroszkópiát is ki lehet használni mind DNS-, illetve fehérjekötődési, mind CyD komplexek vizsgálatára. A két

módszer érzékenysége hasonló, azonban a CD spektroszkópiából több szerkezeti információ nyerhető a kölcsönhatásokról.

A DNS bázispárok 200-350 nm között abszorbeálják a fényt, az elnyelési maximum 260 nm körül jelenik meg. Ligandummal való titrálás során lehetőség van, hogy mind a maximum helye, mind a maximum intenzitása megváltozzon, amely jelzi a kölcsönhatás létrejöttét. A spektrális változásokat a ligandum abszorpciós tartományában is hasonló módon lehet vizsgálni[19, 84].

Az UV spektroszkópiát gyakran használják DNS kötődési állandók meghatározására, amennyiben a nukleinsav és a molekula között csak és kizárólag egyfajta kölcsönhatás jön létre[85–87].

A kötődésre az alábbi egyenletet és a hozzá tartozó egyensúlyi állandót (K) lehet felírni (10-11. egyenletek):



$$K = \frac{[DNS:L]}{[DNS][L]} \quad (11)$$

ahol a $[DNS]$, a $[L]$ és a $[DNS:L]$ rendre a DNS, a ligandum és a kialakult komplex egyensúlyi koncentrációját jelöli.

A kötődési állandót ki lehet fejezni a DNS (c_{DNS}), a ligand (c_L) és a komplex (c_K) koncentrációját felhasználva:

$$K = \frac{c_K}{(c_{DNS} - c_K)(c_L - c_K)} \quad (12)$$

A DNS és a komplex koncentrációja kifejezhető a Lambert-Beer-törvényt felhasználva az alábbiak szerint:

$$c_{DNS} = \frac{A_0}{\epsilon_{DNS} \times l} \quad (13)$$

$$c_K = \frac{A - A_0}{\epsilon_K \times l} \quad (14)$$

A_0 jelenti az abszorpciót a ligandumot nem tartalmazó oldatban, A az adott ligandum-koncentráció esetén mérhető abszorpció, ε_{DNS} és ε_K a DNS és a komplex moláris extinkciós koefficiensei, l pedig a fényúthossz.

Az 12-14. egyenleteket összevonva megkapjuk, hogy

$$\frac{A_0}{A - A_0} = \frac{\varepsilon_{DNS}}{\varepsilon_K} + \frac{\varepsilon_{DNS}}{\varepsilon_K \times K} \times \frac{1}{c_L} \quad (15)$$

$(A_0/A-A_0)$ -t $1/c_L$ függvényében ábrázolva lineáris összefüggést kaphatunk, és ilyenkor a tengelymetszet és a meredekség hányadosa adja meg a ligandum kötődési állandóját.

Az UV spektroszkópia könnyen alkalmazható CyD komplexek vizsgálatára is, azonban a komplex szerkezetéről nagyon kevés információt szolgáltat. A kölcsönhatás kialakulására szintén a különböző spektrális eltolódási effektusok utalnak[88], azonban ez a változás nem mindig karakterisztikus. Hasonló megfontolások mellett alkalmazható a technika fehérjék kölcsönhatásainak vizsgálatára is[89].

1.3.2.2. Fluoreszcens technikák

A különböző, fluoreszcencián alapuló módszereket gyakran alkalmazzák DNS-sel kapcsolatos vizsgálatokban. Előnyük számos más eljárással szemben az érzékenység, a széles linearitási tartomány, valamint a szelektivitás. Fluoreszcens anizotrópia módszerrel meg lehet határozni a fluoreszcenciásan aktív vegyületek DNS-hez viszonyított orientációját, fluoreszcenciás kioltási kísérletekkel pedig a kötődés lokalizációját és típusát[19].

A fluoreszcens emisszió igen érzékeny a környezet változásaira, így amennyiben egy vegyület más környezetbe kerül, az a spektrumon a sávok néhány nm-es eltolódásában mutatkozik meg. Akárcsak az UV spektroszkópiánál, itt is lehetőség van vizsgálatokra a DNS vagy a ligandum spektrumában történő változások megfigyelésével és elemzésével.

Indirekt módszereket is lehet alkalmazni, ilyen esetben a mérés kezdetén egy ismert kötődésű vegyületet adnak a DNS-hez, amelyet a kérdéses vizsgált molekula kiszoríthat a kötőhelyről, spektrális változásokat eredményezve[90].

CyD komplexek vizsgálatára is lehet alkalmazni fluoreszcens módszereket. A legegyszerűbb eset, amikor maga a vendégmolekula rendelkezik fluoreszcenciával[91] és

ez változik meg komplexképződés hatására, vagy egy nem fluoreszkáló vendégmolekula szorít ki egy fluoreszkálót a CyD üregéből. Lehetőség van akár a CyD[92], akár a vendégmolekula fluoreszcens jelölésére, azonban ilyenkor figyelembe kell venni, hogy a fluorofór ne befolyásolja a komplexképződést.

Egy speciális technika a fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia, amely nem a spektrális változásokat követi figyelemmel, hanem a fluorofór diffúziós koefficiensének változását a komplexképződés hatására. Ezzel kiküszöbölhető az a probléma, hogy a fluorofórnak részt kell vennie a komplexképződésben, mert a diffúziós koefficiens a molekulatömeg változására érzékeny[93].

A fehérjékben található aminosavak közül három, a triptofán, a tirozin és a fenilalanin fluoreszkál, kiemelt jelentősége azonban a triptofán fluoreszcenciájának van, mert ez a legérzékenyebb a közvetlen környezet változásaira (és ez található meg legnagyobb mennyiségben a három közül a citoplazmatikus és membránfehérjékben)[94]. Ennek következtében a fehérjekötődés monitorozására lehetőség van a spektrális változások megfigyelésén keresztül még abban az esetben is, ha a kötődő vegyület nem fluoreszkál[95, 96].

1.3.2.3. Mágneses magrezonancia (NMR) spektroszkópia

Az NMR spektroszkópia szolgáltatja a legrészletesebb és legtöbb információt a gyógyszer-DNS kölcsönhatásokról. A sokféle NMR módszer közül a ^1H -t használják a leggyakrabban, de ^{31}P NMR is elterjedt, mert érzékeny a DNS konformációs változásaira. A méréseket el lehet végezni különböző paraméterek változtatásaival (pH, oldószer, hőmérséklet stb.), így lehetőség van a fiziológiai körülmények szimulálására is. Az 4. táblázat tartalmazza a DNS-ben található protonok jellemző eltolódásait. Az eltolódási értékek jelentősebb megváltozása utal a DNS-kötődésre[90].

4. táblázat: A DNS jellemző ¹H-NMR eltolódásai

Proton típusa	Várható kémiai eltolódás (ppm)	Proton típusa	Várható kémiai eltolódás (ppm)
T5 (CH ₃)	1,00 – 2,00	C5 (CH)	5,30 – 6,20
Cukor 2' (CH ₂)	2,00 – 3,00	A2 (CH); A8 (CH); G8 (CH); T6 (CH); C6 (CH)	6,50 – 8,20
Cukor 5' terminális (CH ₂)	3,70	C4 (NH ₂)	6,40 – 6,80
Cukor 5' (CH ₂); 4' (CH)	4,00 – 4,50	C4 (NH ₂)	8,30 – 8,50
Cukor 3' (CH)	4,50 – 5,20	G 1 (NH)	12,50 – 13,00
Cukor 1' (CH)	5,30 – 6,20	T 3 (NH)	13,50 – 14,00

Az 1D NMR mellett alkalmazhatóak még a különféle 2D módszerek is, amelyek közül a leggyakoribb a homonukleáris korrelációs spektroszkópia és a nukleáris Overhauser-effektus spektroszkópia, de számos más eljárás is használható.

Egy igen jól alkalmazható módszer a DNS kölcsönhatások vizsgálatára a differencia frekvencia szaturáció transzfer differencia NMR (DF-STD-NMR), amellyel lehetőség van a kötődés módjának meghatározására, azáltal, hogy a DNS protonokat szelektíven besugározzuk az alifás és az aromás tartományban. Amennyiben a ligandum a DNS bázispárokkal lép kölcsönhatásba, mint az interkalátorok, abban az esetben az aromás besugárzásnál kap több szaturációt. Amennyiben viszont a DNS kettős hélixével hat kölcsön úgy az alifás régióban történő besugárzás lesz rá nagyobb hatással. Az STD adatok kiértékeléséhez vezették be a BMI, vagyis kötődési index („*binding mode index*”) definícióját (16. egyenlet).

$$BMI = \frac{\sum_i \left(\frac{SN_{aromás}/SN_{ref}}{SN_{alifás}/SN_{ref}} \right)}{n_i} \quad (16)$$

Az egyenletben szereplő $SN_{aromás}$, $SN_{alifás}$ és SN_{ref} jelöli rendre az aromás, az alifás és az „*off resonance*” besugárzású spektrumokban megjelenő STD jelek jel-zaj arányát, n_i pedig a figyelembe vett magok számát. Amennyiben az így számolt érték 0 és 0,5 közé esik, úgy a vegyület a DNS külső felszínéhez kötődik, ha 0,9 és 1,1 közé, akkor kisárok kötődésről beszélünk. 1,2 (0,9) és 1,5 közötti érték esetén a ligandum a bázispárok közé interkalálódik be[97].

CyD komplexáció vizsgálata esetén szintén az egyes magok kémiai eltolódása, valamint annak változása ad információt a folyamatról. Amennyiben a folyamat során megváltozik valamelyik magra jellemző eltolódás, abban az esetben komplexképzés indukálta kémiai eltolódásnak (CIS - $\Delta\delta$) nevezzük a jelenséget. A komplexek vizsgálata esetén a mért jel ($\delta_{mért}$) a szabad (δ_{sz}), valamint a komplexált (k) forma móltörttel (χ) súlyozott átlagaként jelenik meg (17. egyenlet).

$$\delta_{mért} = \chi_k \delta_k + \chi_{sz} \delta_{sz} \quad (17)$$

A CIS pedig a szabad forma jele és a mért jel közötti különbségből számolható a 18. egyenlet szerint.

$$\Delta\delta = \delta_{sz} - \delta_{mért} \quad (18)$$

Jobb módszerrel a CIS-t felhasználva lehetőség van a komplex sztöchiometriájának megállapítására, ROESY („rotating frame nuclear Overhauser effect spectroscopy”) NMR kísérletek (esetlegesen molekulamodellezéssel kiegészítve) pedig a komplex geometriájáról nyújtanak szerkezeti információkat[98, 99].

A fehérjekötődés vizsgálatát kétféle módon lehet elvégezni. Az egyik esetben a fehérje paramétereit vizsgálják ligandum jelenlétében, illetve nélkül („protein-observed NMR”), a másik esetben viszont a ligandum paramétereit vizsgálják a fehérje jelenlétében, valamint fehérje nélkül („ligand-observed NMR”). Előbbi esetben hátrány a hosszú mérési idő, a 3D szerkezet felderítéséhez szükséges izotópos jelzés, valamint, hogy stabil, jól oldódó fehérjére van szükség, emiatt a gyakorlatban ezt 30 kDa alatti fehérjék esetében szokták alkalmazni. Ligandum vizsgálata esetén nincsen szükség izotópos jelzésre, valamint elegendő kevesebb fehérje felhasználása, illetve nagyobb molekulatömegű fehérjék vizsgálatára is van lehetőség[100]. Ezen felül itt is alkalmazható a szaturációs módszer[97].

1.3.3. Elválasztástechnikai módszerek

Kölcsönhatások vizsgálatára lehetőség van elválasztástechnikai módszerek, mint a CE és HPLC alkalmazásával is.

CE során a megfelelő pufferben oldott mintát egy kvarc kapillárisban futtatják, amelynek két végére feszültséget kapcsolnak. A kapilláris szilanolos OH-csoportjairól $\text{pH} > 2,5$ esetén a hidrogénionok disszociálnak, így egy negatív töltésű felület jön létre, amely magához vonzza a puffer kationjait és ezáltal egy elektromos kettősréteg jön létre. A feszültség hatására a kationok a negatív töltésű elektród irányába fognak áramlani, mozgásba hozva a kapillárisban lévő oldatot benne a mintával. Ez az úgynevezett elektroosmotikus áramlás (EOF). A minta komponenseinek elválasztása azok elektroforetikus mobilitásán alapul, amely a töltés és a részecskeméret függvénye. Ezt az Offord-szabály írja le, miszerint a mobilitás arányos a töltéssel és fordítottan arányos a molekulatömeg kétharmad részével. A pozitívan töltött részecskék migrációs ideje rövidebb a módszer elvéből fakadóan, azonban a negatívan töltött DNS-fragmensek is eljutnak a detektorig néhány perc alatt az EOF segítségével. A módszerrel akár az azonos hosszúságú, de különböző szekvenciájú DNS-fragmenseket is el lehet választani [101]. Miután a DNS-hez kötődő vegyületek nagy többsége pozitív töltéssel rendelkezik, így kötődés esetén a komplex töltése meg fog változni a szabad DNS töltéséhez képest, ennek megfelelően változás következik be a migrációs időben. A módszert abban az esetben lehet alkalmazni, ha a komplex élettartama megfelelően hosszú; ez általában a kisárokba kötődő vegyületekre jellemző [102, 103].

HPLC is alkalmazható DNS-kötődés vizsgálatára (akár tömegspektrometriával kapcsolva), azonban a többi módszer mellett ritkán szokták felhasználni; elsődlegesen kovalens adduktok analízisében alkalmazzák. Legnagyobb hátránya a hosszú mérési idő (kb. 30 perc) [104, 105].

A CyD-eket mind a HPLC-ben, mind a CE-ben elsődlegesen királis elválasztásra alkalmazzák, aminek feltétele a királis felismerés. A CyD-ek a különböző enantiomerekkel eltérő stabilitású komplexet képeznek, amely a retenciós és a migrációs időbeli különbségben mutatkozik meg. Mindkét módszernél lehet a komplexképzőt alkalmazni állófázisként vagy additívként a mozgófázisban feloldva. CE-nél vagy a ligandumnak vagy a CyD-nek töltéssel kell rendelkeznie, a semleges molekulákat nem lehet közvetlenül tesztelni [106].

Amennyiben CyD állófázist használnak HPLC-s elválasztások során, abban az esetben normál és fordított fázisú kromatográfiás rendszerek is alkalmazhatóak. Hátrány, hogy minden egyes CyD teszteléséhez külön oszlopra van szükség. Az eluensben oldott

CyD-ek esetében a fordított fázisú kromatográfiás rendszerek használata jellemző[107, 108].

A fehérjéket fel lehet használni affinitás kromatográfia formájában az elválasztástechnikában. A módszer két molekula közötti specifikus biológiai kölcsönhatásokon alapul, mint például enzim-szubsztrát, receptor-ligandum vagy antitest-antigén interakciók. Ennél a technikánál a ligandumot rögzítik az állófázison, majd egy, a célmolekulát is tartalmazó fehérjekeveréket juttatnak rá, amelyből csak a célmolekula fog kötődni az állófázishoz, minden más komponens kölcsönhatás nélkül eluálódik. Ezután a célmolekulát megfelelő puffer megválasztásával lehet lemosni az oszlopról, így egy nagy tisztaságú fehérje az eredmény[109]. HPLC-s technikát lehet alkalmazni gyógyszerek fehérjekötődésének a vizsgálatára, amennyiben a szérumfehérjét állófázison immobilizálják. A módszer abban az esetben ad megbízható eredményt a fehérjekötődés mértékéről, amennyiben a gyógyszer elsősorban az állófázisként alkalmazott fehérjéhez kötődik az élő szervezetben. Amennyiben ez nem áll fent, úgy a kromatográfiás módszer által kapott érték alacsonyabb lesz a valóságnál[110]. A módszerrel vizsgálható az enantioszelektív kötődés, a relatív kötődési erősség és a kompetitív kizorítás a kötőhelyekről[111]. Ezen felül a fehérje alapú állófázisokat királis elválasztásra is alkalmazzák, akár csak a CyD-eket.

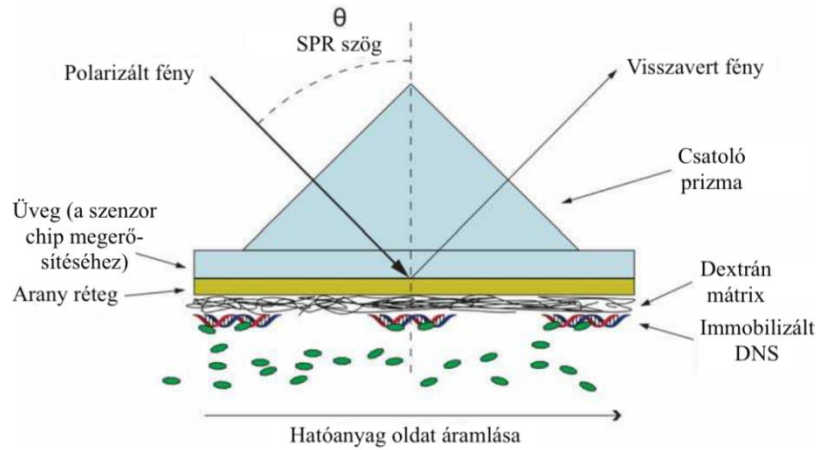
A CE technikák közül több módszert is lehet alkalmazni a fehérjekötődések vizsgálatára. Ezek egy részénél a szabad ligandum (pl.: frontális analízis), más esetekben a fehérjékhez kötött molekulák koncentrációját (pl.: Hummel-Dreyer-módszer) mérik UV detektálással. A módszereket egymással kombinálva lehetőség van a kötődési állandók, valamint a kötőhelyek számának meghatározására, a migrációs idők megváltozása alapján[112, 113].

1.3.4. Egyéb módszerek

1.3.4.1. Surface Plasmon Resonance (SPR)

A *surface plasmon resonance* (SPR) technika alapja a fényvisszaverődés. Ha egy prizmat, amelynek a felülete valamilyen fémből készült filmréteggel van bevonva, különböző szögben beeső fényvel világítanak meg, úgy adódik egy ún. kritikus szög/SPR szög, amikor a fénynyaláb oszcillációt gerjeszt a fém filmrétegben, és ez a szög függ a fém felületen lévő anyagtól. A fém felületére rögzíteni lehet mind a vizsgálni kívánt

makromolekulát, mind a ligandumot, majd a másik reaktáns oldatát át kell ezen áramoltatni. Amennyiben komplexképzés történik, úgy az oszcilláció gerjesztéséhez szükséges kritikus szög megváltozik, amelyet lehetőség van monitorozni (12. ábra). A módszerrel vizsgálható a DNS- és fehérjekötődés, illetve CyD komplexképzés is[90, 114–116].



12. ábra: A SPR sematikus felépítése [90]

1.3.4.2. Enzimatiskus módszerek - „footprinting”

A módszerrel a gyógyszerek szekvenciaszelektivitását lehet vizsgálni. Alapja, hogy amennyiben egy vegyület kölcsönhatásba lép a DNS valamely szekvenciájával, úgy gátolja az enzimatiskus hasítást azon a ponton. A vizsgálathoz szükség van a DNS molekula valamilyen jelölésére, amely lehet ^{32}P vagy ^{33}P izotóp, de fluoreszcens jelöléseket is szokás alkalmazni. A ligandummal reagáltatott DNS szakaszt enzimekkel hasítják (pl. DNáz I enzim), majd poliakrilamid gélen elválasztják. Az így keletkezett fragmenseket egy referenciával összehasonlítva meg lehet állapítani, hogy történt-e kötődés a vizsgált szekvenciához[90, 117].

2. Célkitűzések

A doktori munka célkitűzése volt, hogy megvizsgáljuk a cirkuláris dikroizmus spektroszkópia egy sajátos ágának, az indukált cirkuláris dikroizmus spektroszkópiának a felhasználási lehetőségeit. Az ICD jelensége régóta ismert, azonban sem a gyógyszerkutatásban, sem a gyógyszeranalitikában nem alkalmazzák, annak ellenére, hogy fontos információt szolgáltat a hatóanyag és különféle makromolekulák vagy biopolimerek kölcsönhatásairól.

Célkitűzéseink között szerepelt hatóanyagok DNS-sel, valamint fehérjével történő kölcsönhatásainak vizsgálata, továbbá a gyógyszerészetben széles körben felhasznált ciklodextrinek komplexképző tulajdonságainak vizsgálata.

A hatóanyagok DNS-kölcsönhatásának vizsgálata alapjául szolgálhat egy *in vitro* genotoxicitási előszűrésnek, a fehérjékkel való komplexképzéssel újonnan fejlesztett hatóanyagok esetében előre jelezheti a plazmafehérjékhez való kötődés mértékét. Ciklodextrinek esetén az adott hatóanyag számára leginkább megfelelő ciklodextrin kiválasztásához kívántunk gyors és informatív módszert fejleszteni.

3. Módszerek

3.1. A kísérletes munka során felhasznált anyagok

A munka során felhasznált csirke eritrocita DNS-t a Reanal, a borjú csecsemőmirigy és a lazac sperma DNS-eket, a dimetil-szulfoxidot (DMSO), az etídium-bromidot és a berenilt pedig a Sigma-Aldrich-től szereztük be. A pUC18 plazmid DNS-t az Agilent Technologies gyártotta.

A szunitinib bázist a Vichem Chemie Kutató Kft. biztosította számunkra. A kurkumin, valamint az arisztolochiasav I szintén a Sigma-Aldrich terméke volt. A szintetikus kurkuminoidokat a Pécsi Tudományegyetem Gyógyszerészi Kémiai Intézetében szintetizálták.

A különféle CyD-ek a CycloLab Kft.-től származtak. A szubsztituált CyD-ek jellemző paramétereit az 5. táblázatban tüntettük fel. A flukonazol, a mikonazol és a bifonazol a Sandoz termékei voltak, míg a klotrimazolt és a tiokonazolt szintén a Sigma-Aldrich-től szereztük be.

A fehérjekötődési vizsgálatokhoz felhasznált humán szérum albumin és a nimeszulid is a Sigma-Aldrich-től származott.

Az ioncserélt vizet Milli-Q Direct 8 víztisztító rendszerrel állítottuk elő.

5. táblázat: A szubsztituált CyD-ek jellemző paramétereit

Név	Rövidítés	Szubsztituáltsági fok	Molekulatömeg (g/mol)
heptakis-(2,6-di-O-metil)- β -ciklodextrin	DMBCyD	14	1331,0
heptakis-(2,3,6-tri-O-metil)- β -ciklodextrin	TMBCyD	21	1429,0
szulfobutiléter- β -ciklodextrin nátrium sója	SBBCyD	6,5	2163,3
karboximetil- β -ciklodextrin nátrium sója	CMBCyD	3,5	1415,0
(2-hidroxi-propil)- β -ciklodextrin	HPBCyD	4,5	1396,5

3.2. CD spektroszkópia

A CD spektroszkópiás mérések Jasco J-720, illetve Jasco J-815 spektropolariméteren történtek, utóbbi egy keverővel ellátott Peltier típusú termosztáttal volt felszerelve. A kísérletek során a fényúthosszt úgy választottuk meg, hogy a

spektropolariméteren a CD jellel párhuzamosan regisztrált UV spektrumban az abszorbancia értéke ne haladja meg a 2-t.

A természetes DNS-ekből 0,1 mg/ml koncentrációjú törzsoldat készült desztillált vízzel a felhasználás előtt 24 órával és a felhasználásig 4°C-on volt tárolva.

A spektrumfelvételi paramétereket az 6. táblázat foglalja össze.

6. táblázat: A CD spektroszkópiás mérések paraméterei

	felvételi sebesség (nm/perc)	akkumuláció száma	részélesség (nm)
DNS CD spektrumok	50	3	2
plazmid validálás	200	5	2
kurkumin és kurkuminoidok	200	3	2
szunitinib vizsgálata	200	3	2
arisztolochiasav I vizsgálata	200	3	2
antifungális azolok vizsgálata	50	3-5	2
nimeszulid vizsgálata	100	5	2

3.2.1. CD-melting mérések

A DNS CD-melting méréseket Jasco J-815 spektropolariméteren végeztük, 25 – 98°C hőmérséklettartományban, 359 nm-en. A fűtés 1°C/perc sebességgel történt. A kísérletekhez 1 cm hosszúságú kvarc küvettát használtunk.

3.3. pUC18 plazmid DNS preparálás

Az elvégzett kísérletes munka egy részében bakteriális eredetű plazmid DNS-t használtunk. A molekulához a Semmelweis Egyetem Orvosi Biokémiai Intézettel való együttműködés keretében jutottunk hozzá, ahol a preparálást és a tisztítást az alábbi protokoll szerint végezték. Kémiailag kompetens (átjárható sejtfallal rendelkező) *Escherichia coli* sejteket transzformáltak 5 µl, 0,1 ng/µl koncentrációjú pUC18 plazmid DNS-sel. Ezután 100 ml, 100 µg/µl ampicillint tartalmazó LB tápoldatot inokuláltak

egyetlen baktériumkolóniával, amelyet 37°C-on 180 rpm mellett tenyésztettek 8 órán keresztül. A továbbiakban ebből a tenyészetből 14-14 ml-rel inokuláltak 700 ml friss táptalajt és tovább tenyésztették egy éjszakán keresztül. Az *E. coli*-ból a plazmid DNS felszabadítása QIAfilter Plasmid Giga Kit alkalmazásával történt a gyártó utasításai alapján, majd a megtisztított plazmidot nukleázmentes desztillált vízben oldották. A mintákat további felhasználásig -20°C-on tároltuk. A DNS fontosabb adatait az 7. táblázat tartalmazza.

7. táblázat: A pUC18 plazmid DNS fontosabb paramétere

Bázispárok száma	2686
Molekulatömeg (Da)	1659680
GC-AT arány (%)	50,7:49,3

3.4. DF-STD-NMR mérések

Az NMR mérések elvégzéséhez egy 599.9 MHz-es Varian VNMR5 spektrométert használtunk, amely kétcsatornás, inverz detektálásos gradiens mérőfejjel volt felszerelve. A plazmid DNS-ből és a ligandumból D₂O-val készült oldat, hogy utóbbi koncentrációja körülbelül 1 mmol/dm³ legyen. Az „*off resonance*” referencia spektrum felvétele -16 ppm-es besugárzással történt 128-as akkumuláció mellett, 4 másodperces szaturációval.

3.5. Stabilitási állandók számítása

Az antifungális azolok és a nimeszulid komplexek stabilitási állandóinak számítása nemlineáris paraméterillesztést alkalmazva történt Origin Pro 8.5 szoftvert felhasználva, az alábbiak figyelembevételével. 1:1 arányú komplex képződése esetén a következő egyensúlyi állandót lehet felírni:

$$K_e = \frac{[HG]}{[H_e][G_e]} \quad (19)$$

ahol K_e jelöli a komplexképződés egyensúlyi állandóját, $[H_e]$ a gazdamolekula, $[G_e]$ a vendégmolekula, $[HG]$ pedig a képződött komplex egyensúlyi koncentrációja. Ezeket az egyensúlyi koncentrációkat ki tudjuk fejezni a gazdamolekula $[H_t]$ és a vendégmolekula $[G_t]$ teljes, analitikai koncentrációjának felhasználásával.

$$[H_e] = [H_t] - [HG] \quad (20)$$

$$[G_e] = [G_t] - [HG] \quad (21)$$

A 19-21. egyenletek összevonásával az egyensúlyi állandót az alábbi módon fejezhetjük ki:

$$K_e = \frac{[HG]}{([H_t] - [HG])([G_t] - [HG])} \quad (22)$$

Figyelembe véve a feltételt, hogy $[G_t] \geq [HG] \geq 0$ a 22. egyenletből a komplex egyensúlyi állandóját az alábbi másodfokú egyenlet formájában tudjuk kifejezni:

$$[HG] = \frac{[G_t] + [H_t] + \frac{1}{K_e} - \sqrt{([G_t] + [H_t] + \frac{1}{K_e})^2 - 4[G_t][H_t]}}{2} \quad (23)$$

Konstans vendégmolekula koncentráció mellett növelve a gazdamolekula koncentrációját egy telítési görbét kapunk, amelynek lefutása a komplex stabilitásától és a gazdamolekula feleslegétől függ. A detektált CD jel (θ) szelektív a komplexre, így annak intenzitása a komplex egyensúlyi koncentrációjával arányos, maximális jelet (θ_{max}) pedig akkor kapunk, amikor az összes vendégmolekula már komplexálódott:

$$\theta_{max} \propto [G_t] = [HG] \quad (24)$$

$$\frac{\theta}{\theta_{max}} = \frac{[HG]}{[G_t]} \rightarrow \theta = \frac{\theta_{max}}{[G_t]} [HG] \quad (25)$$

A 23-25. egyenleteket felhasználva tudjuk meghatározni a komplexképződés egyensúlyi állandóit nemlineáris paraméterillesztést alkalmazva. Amennyiben az ellipticitás az alkalmazott CyD (vagy fehérje) feleslegnél eléri a telítési értéket (θ_{max}) úgy a számításnál csak K_e értékét kell becsülni. Ha a telítés az alkalmazott CyD feleslegnél még nem következik be, akkor a paraméterillesztés során θ_{max} becsülésére is szükség van.

4. Eredmények

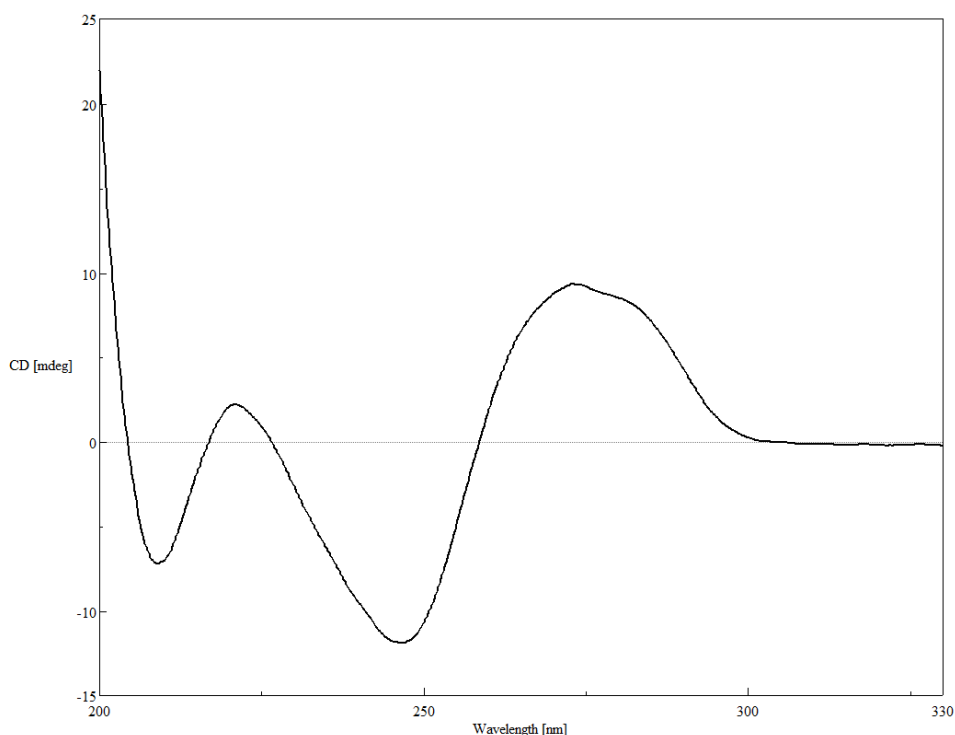
4.1. DNS vizsgálatok

A DNS-kötődési vizsgálatokat többféle DNS-t felhasználva végeztük el. Ezek közül három: a csirke eritrocita (ChE), a borjú csecsemőmirigy (CT) és a lazac sperma (SS) DNS természetes eredetű, lineáris polinukleotidok. Ezek heterogén vegyületek, vagyis a polimerláncok hossza nem egységes. Ezekkel összevetve a tisztított bakteriális eredetű plazmid DNS cirkuláris szerkezettel rendelkezik, amely tovább tekeredve szuperhélixet képez. Nagy előnye ennek a DNS-nek, az előbbiekkal ellentétben, hogy teljesen homogén, ismert a nukleotidlánc szekvenciája.

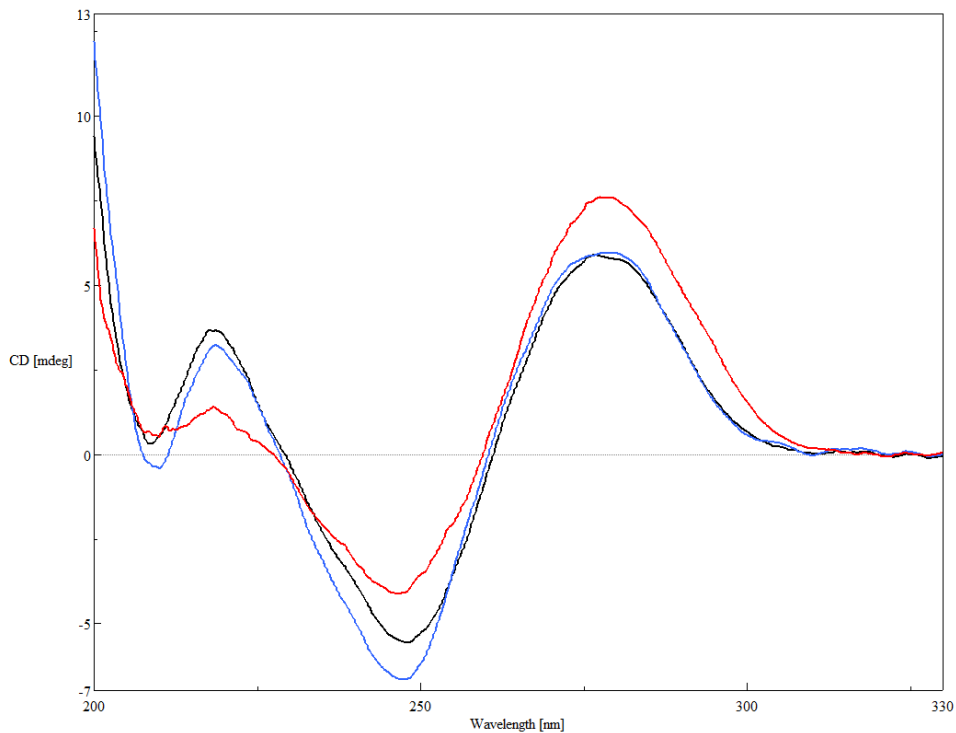
4.1.1. pUC18 plazmid DNS felhasználhatóságának validálása

Kísérleteink során pUC18 plazmid DNS-sel dolgoztunk. A plazmid legfontosabb adatait a 3.3. fejezetben található 6. táblázat tartalmazza.

Ahhoz, hogy megállapítsuk alkalmazható-e a plazmid DNS kötődési vizsgálatokra, először felvettük a molekula saját CD spektrumát, hogy van-e eltérés egy lineáris DNS spektrumához képest. A plazmid DNS spektruma a 13. ábrán, a három másik természetes DNS spektruma pedig a 14. ábrán látható.

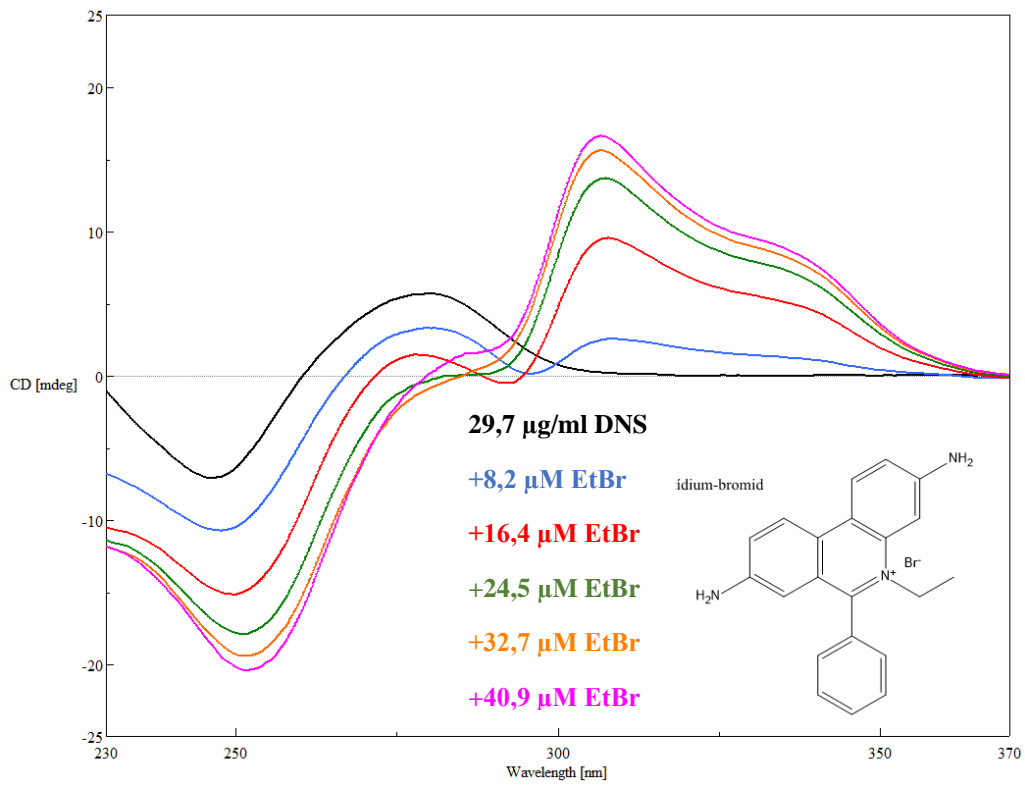


13. ábra: A pUC18 plazmid DNS CD spektruma

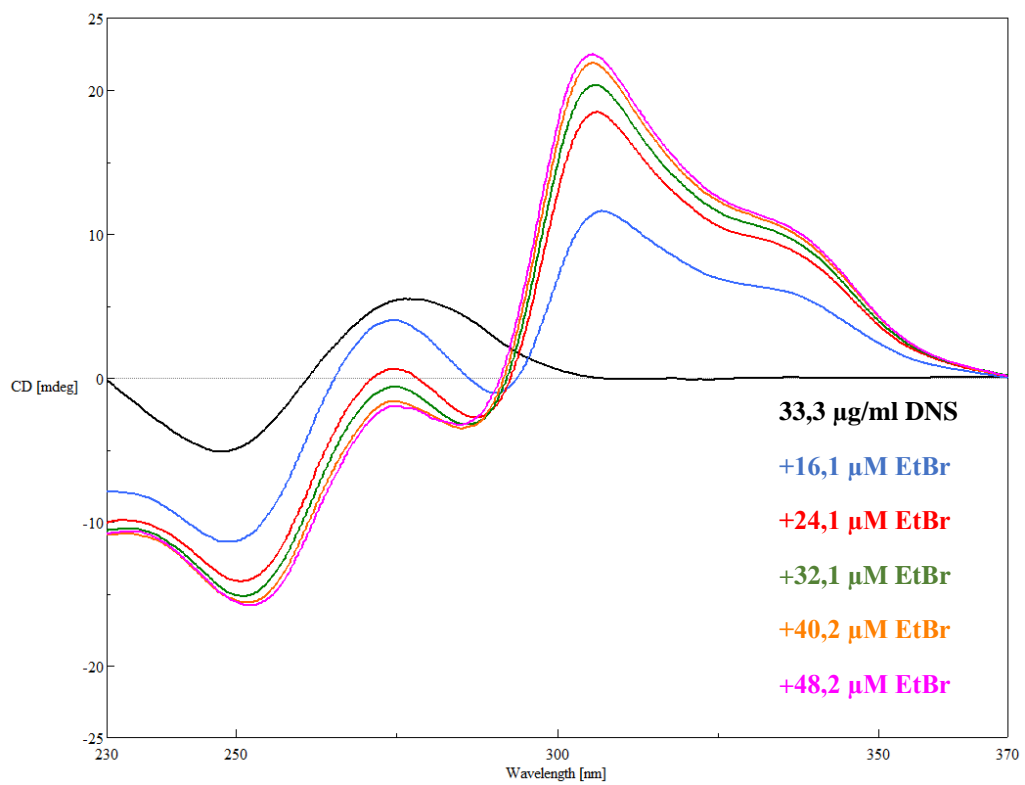


14. ábra: A ChE (fekete), a CT (kék) és a SS (piros) DNS CD spektruma

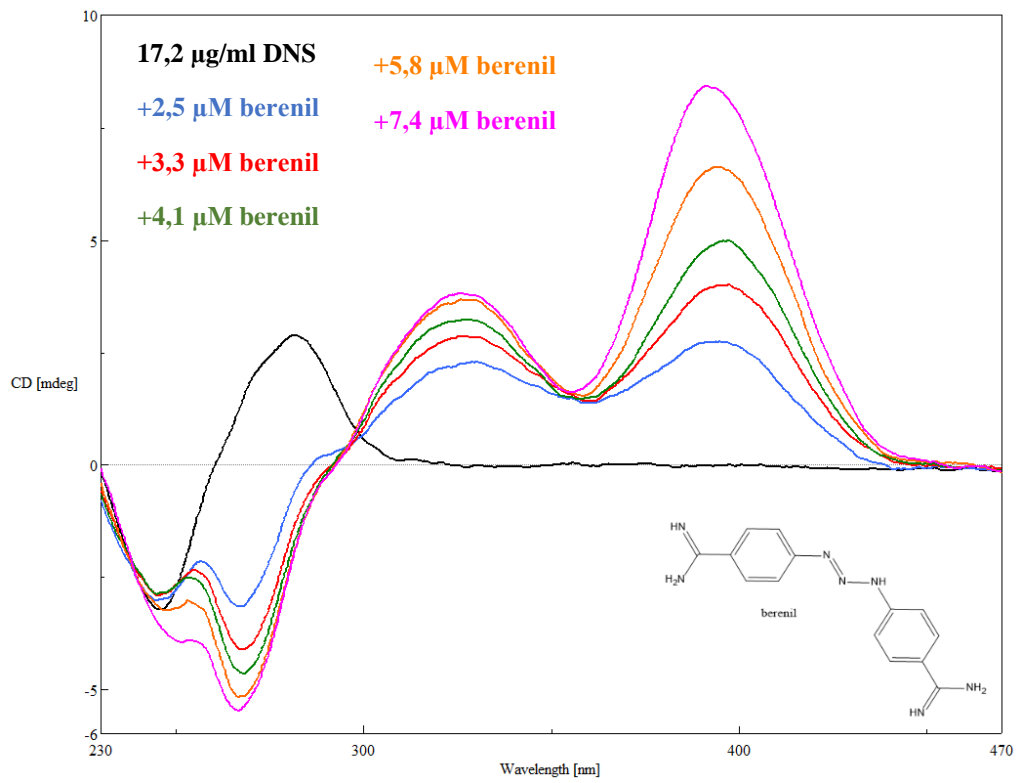
A DNS-ek saját spektrumainak felvétele után két mintavegyülettel, az interkaláló etídium-bromiddal (EtBr), valamint a kisárokba kötő berenillel teszteltük, hogy plazmid DNS esetében a spektrális változások mennyiben hasonlítanak vagy térnek el egy természetes DNS-sel kivitelezett kötődési vizsgálat során regisztrált spektrumtól. A természetes DNS-ek közül a vizsgálatához a ChE DNS-t választottuk. Az interkaláló EtBr-dal való titrálás spektrumai a 15-16. ábrákon láthatóak, míg a kisárokba kötődő berenillel történő kísérlet eredményeit a 17-18. ábrákon tüntettük fel.



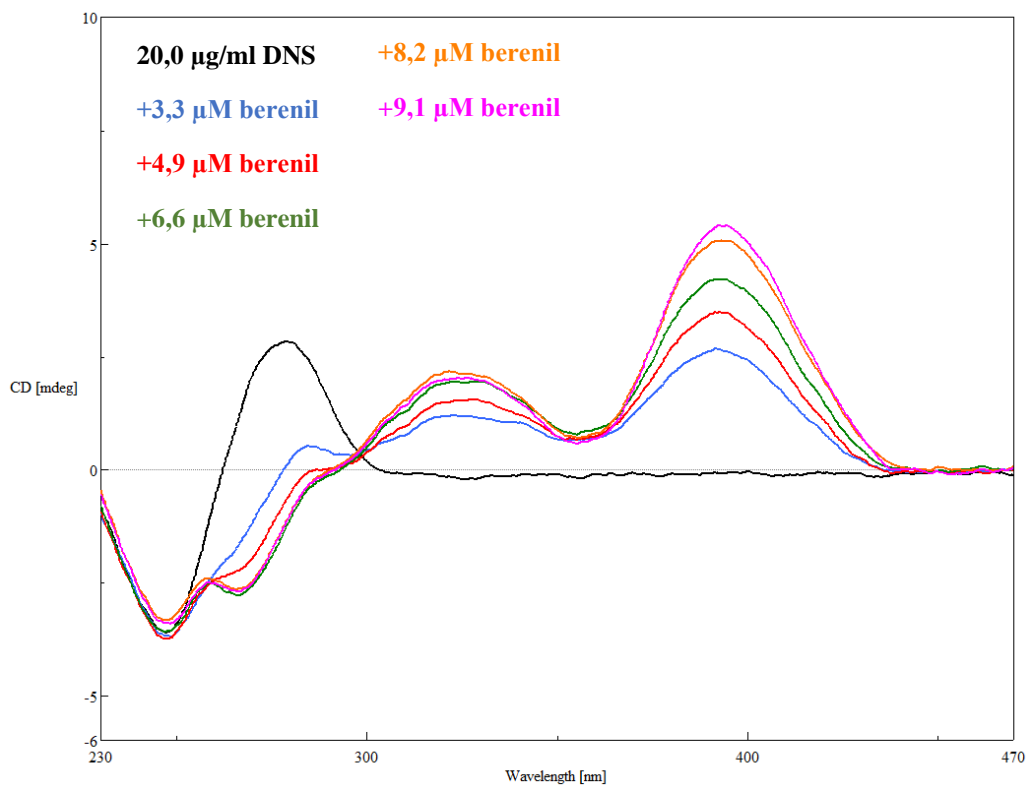
15. ábra: Plazmid DNS titrálása EtBr-dal



16. ábra: ChE DNS titrálása EtBr-dal



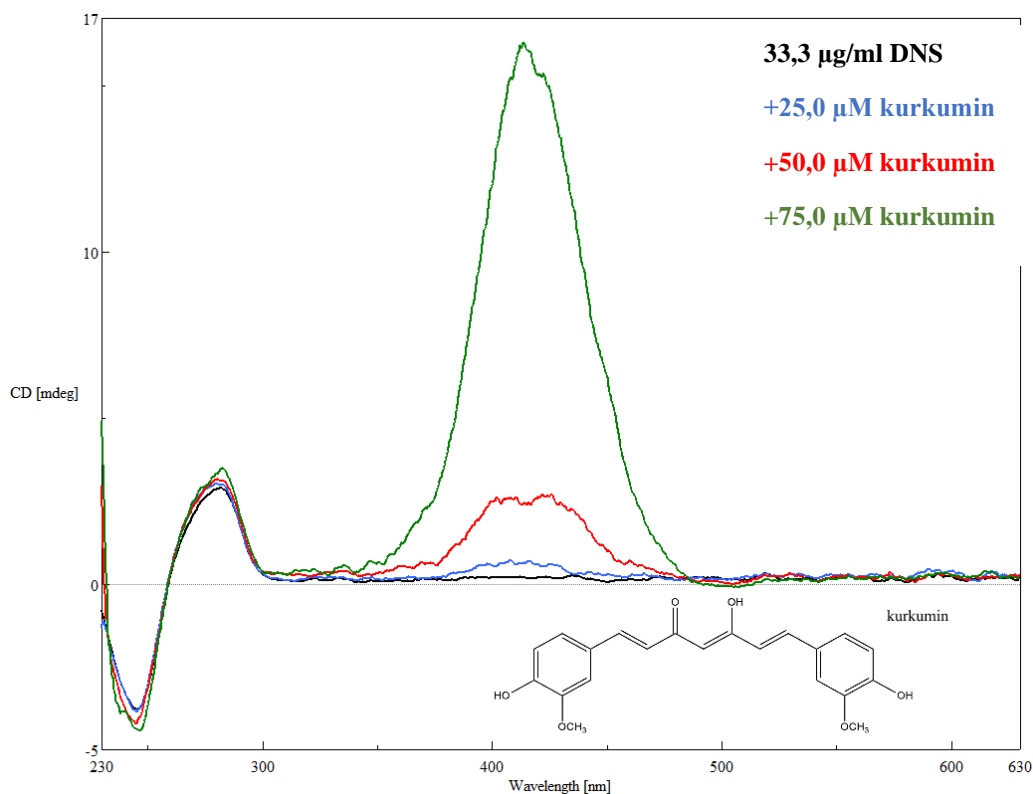
17. ábra: Plazmid DNS titrálása berenillel



18. ábra: ChE DNS titrálása berenillel

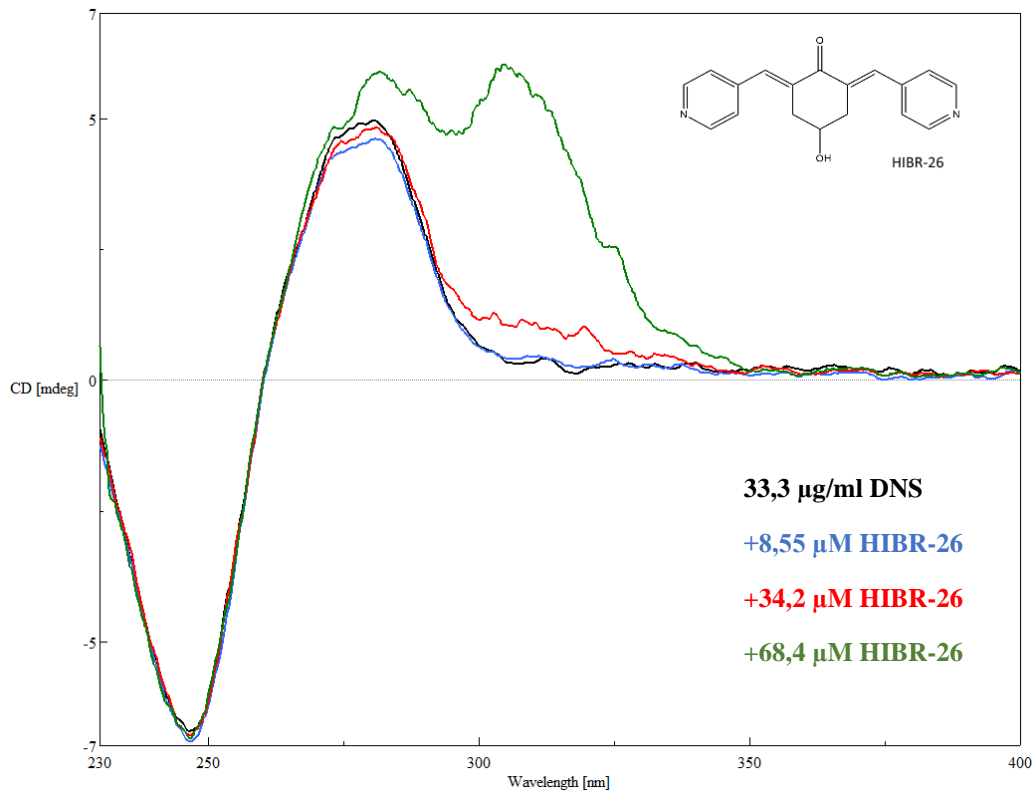
4.1.2. Kurkumin és kurkuminoidok vizsgálata

A kurkumin egy természetes eredetű molekula, amely a kurkuma (*Curcuma longa*) egyik biológiailag aktív vegyülete. A vegyületet, valamint három származékát, a demetoxikurkumint, a biszdemetoxikurkumint és a ciklokurkumint a növény 3-5 %-ban tartalmazza. Ezek közül kiemelt szerepe a kurkuminnak van, amely sejtnövekedést gátló hatással rendelkezik többféle tumor esetében, mint például különböző bőr vagy emésztőrendszeri daganatok[118]. Mielőtt a kurkuminoidokat megvizsgáltuk volna, célszerűnek tűnt, hogy a kiindulási vegyület DNS-kötődését jellemezzük, hogy a kapott eredményeket összevethessük a származékok tulajdonságaival. A kurkumin kötődése során kialakuló spektrum a 19. ábrán látható.

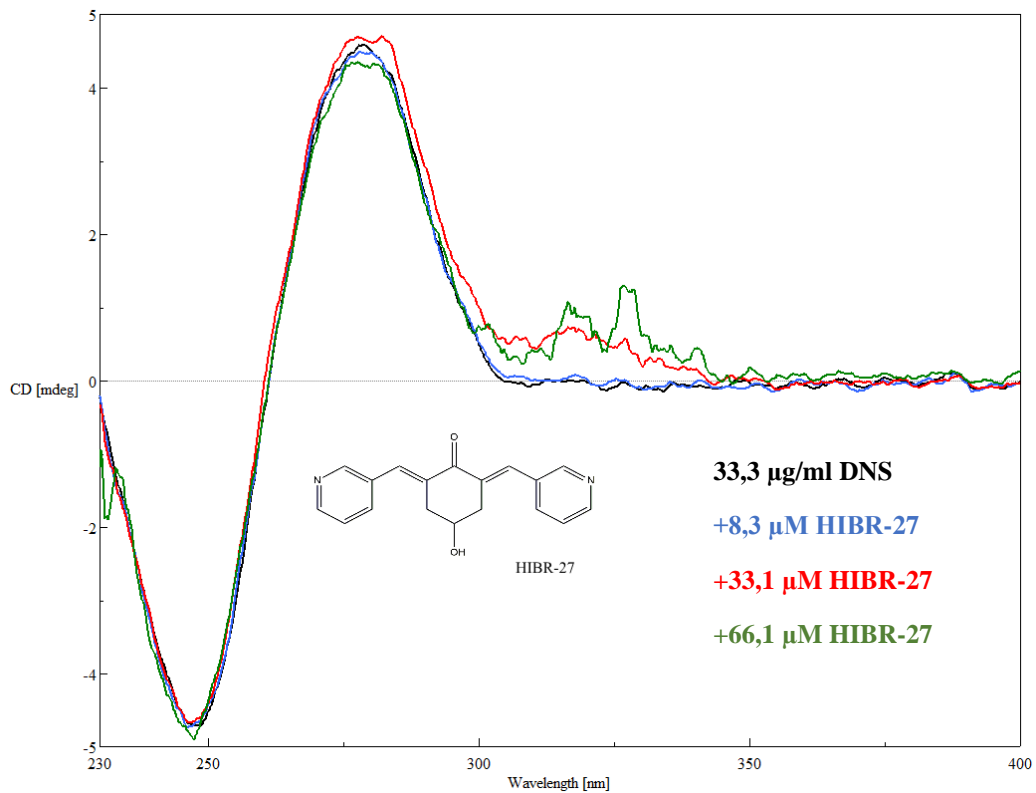


19. ábra: A ChE-kurkumin komplex CD spektruma

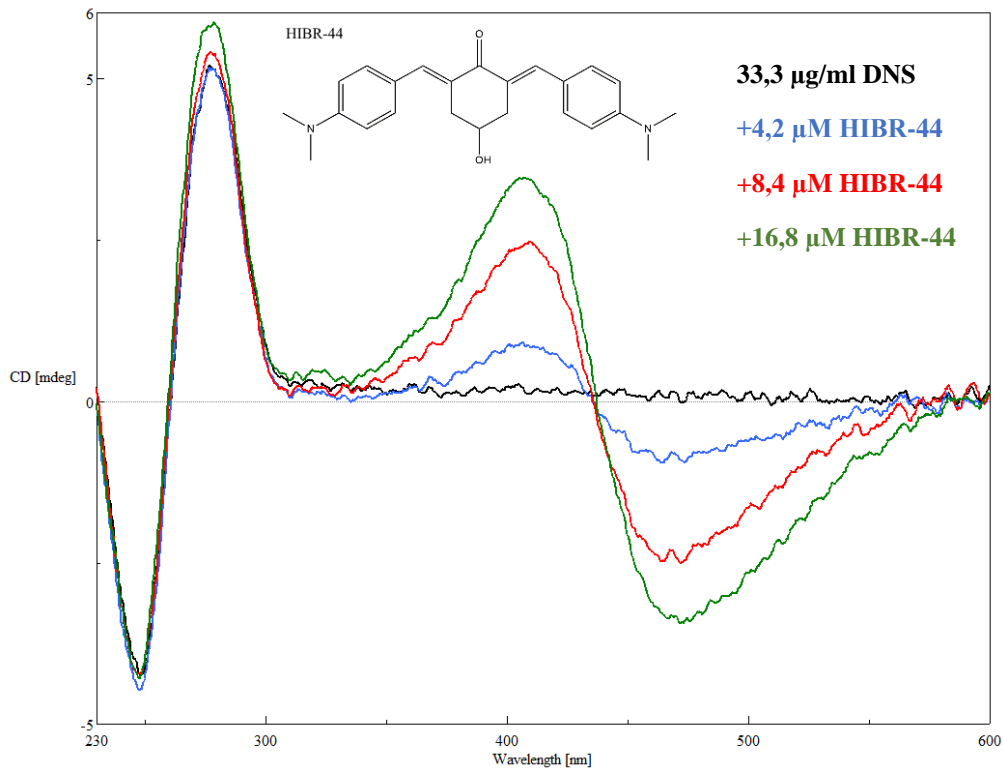
Ezt követően összesen 28 kurkuminoid DNS kötődését vizsgáltuk. A 28 vegyület közül mindösszesen 5 esetben volt kimutatható kötődés a felhasznált ChE DNS-hez: a HIBR-26, HIBR-27, HIBR-44, HIT-205 és HIBR-9 esetén. A regisztrált spektrumok a 20-24. ábrákon láthatók.



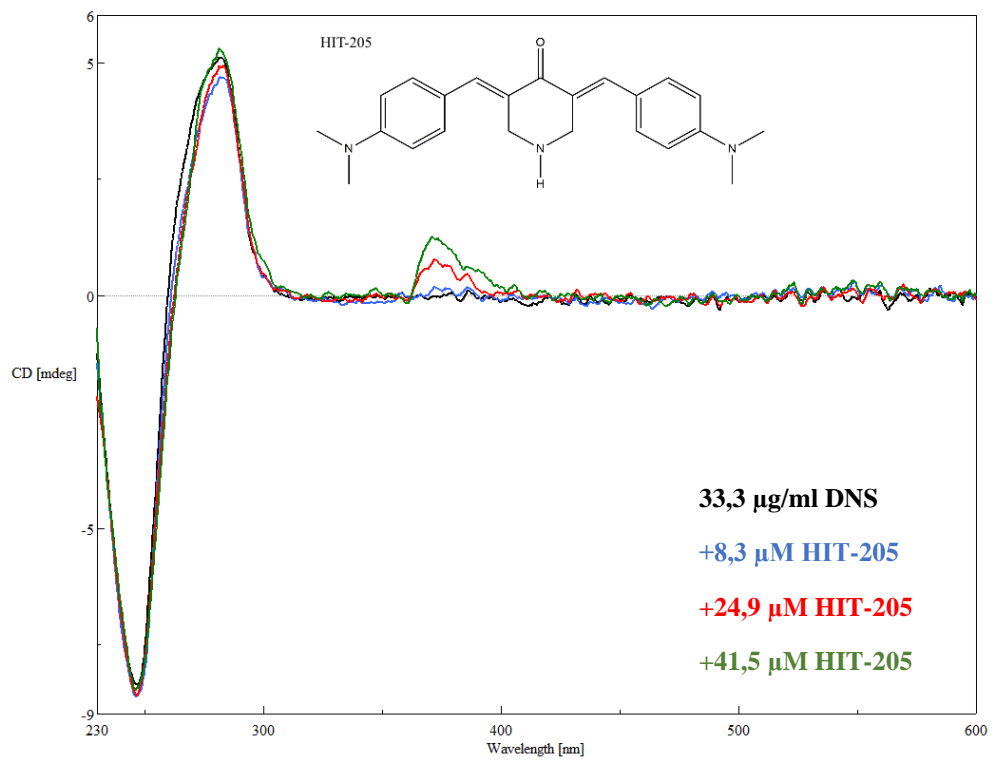
20. ábra: A ChE DNS-HIBR-26 komplex CD spektruma



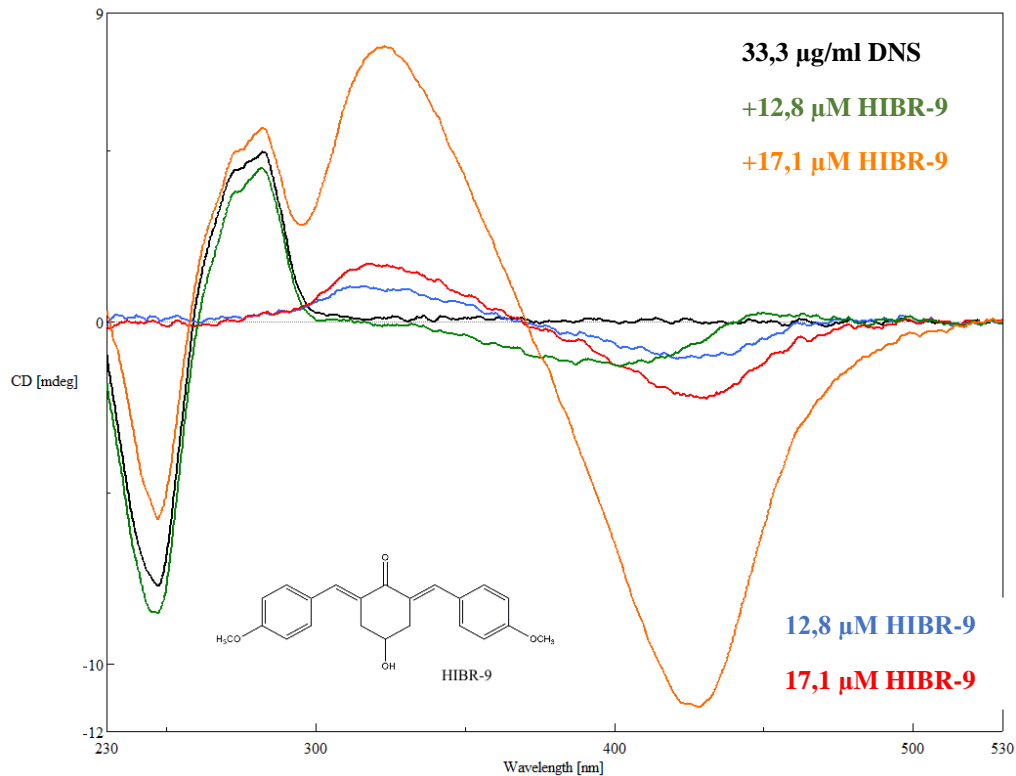
21. ábra: A ChE DNS-HIBR-27 komplex CD spektruma



22. ábra: A ChE DNS-HIBR-44 komplex CD spektruma



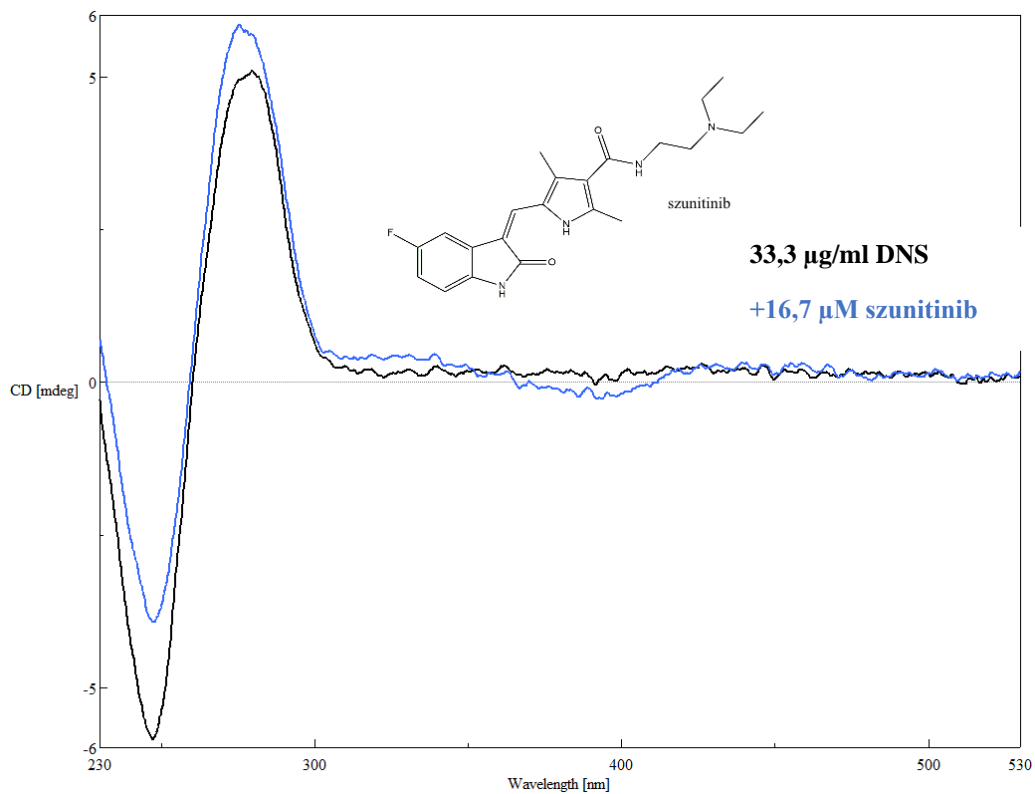
23. ábra: A ChE DNS-HIT-205 komplex CD spektruma



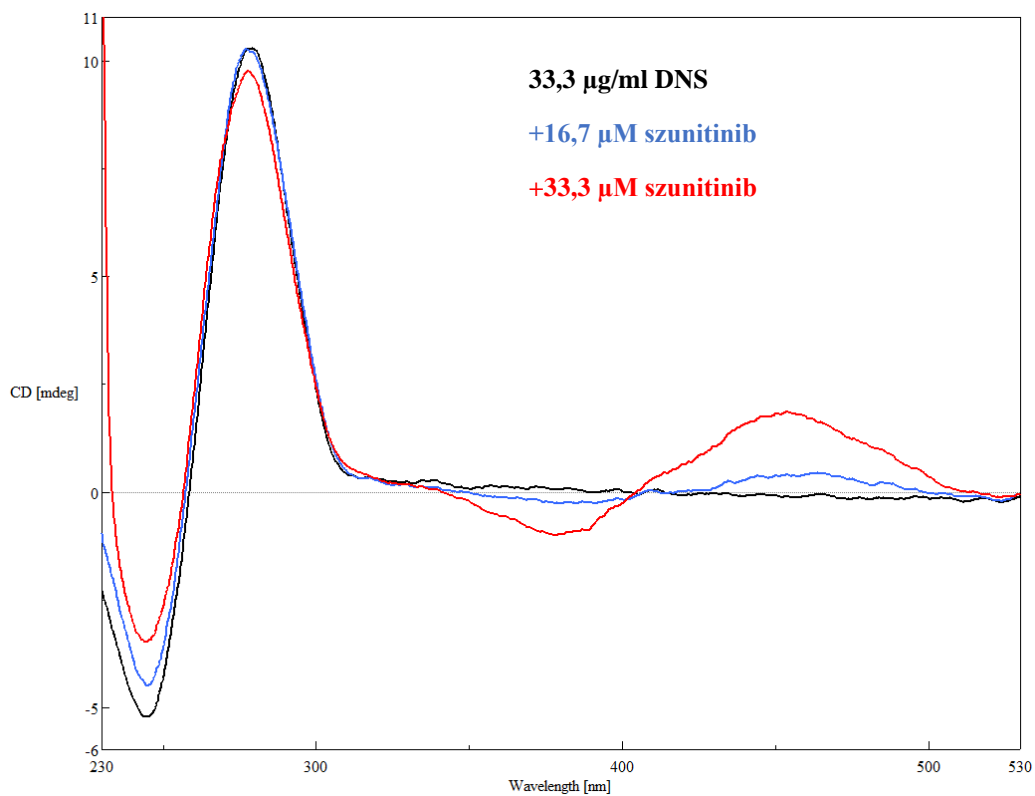
**24. ábra: A HIBR-9 vizsgálata során regisztrált CD spektrumok
piros és kék: a vegyület spektruma DNS nélkül
zöld és okkersárga: a vegyület spektruma DNS-sel**

4.1.3. Szunitinib vizsgálata

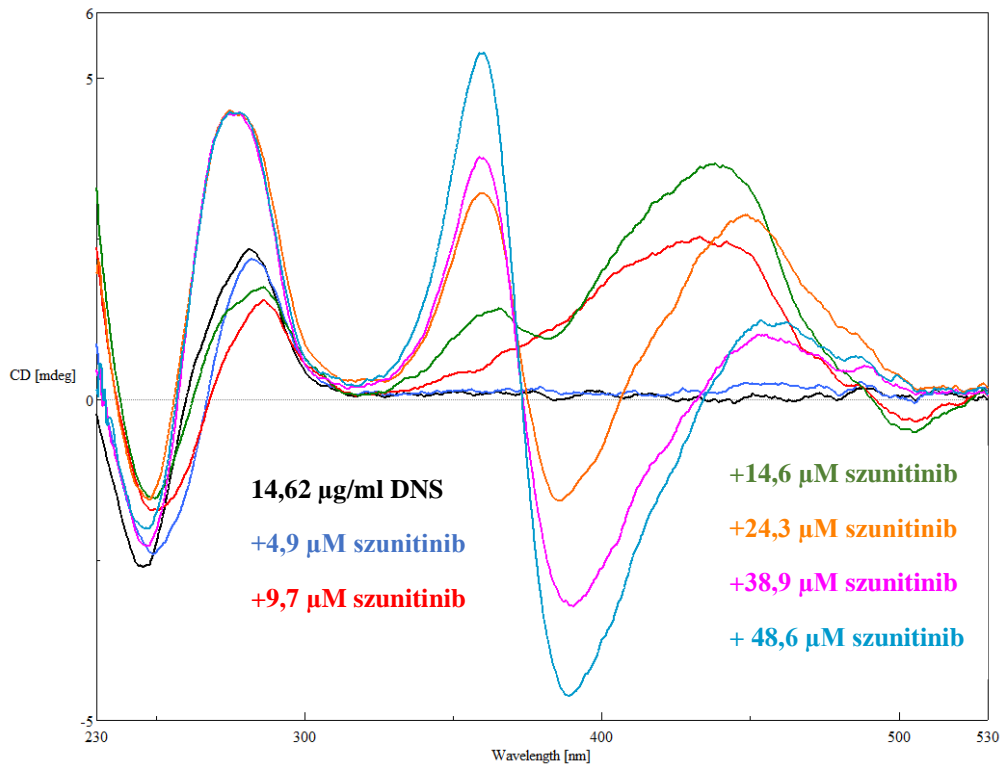
A szunitinib egy nem-szelektív tirozin-kináz inhibitor, amely gátolja többek között a VEGFR-1, a VEGFR-2 (vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptor), az FLT3 (fms-szerű tirozin-kináz), a KIT, a PDGFR α és a PDGFR β (vérlemezké eredetű növekedési faktor receptor) receptorokat [119], azonban szerkezetében jelen vannak olyan elemek, amelyek potenciális DNS-kötő vegyületté teszik, emiatt vizsgáltuk a kötődését először ChE és SS, majd plazmid DNS-hez. A regisztrált spektrumokat a 25-27. ábrákon tüntettük fel.



25. ábra: A szunitinib ChE DNS-kötődése

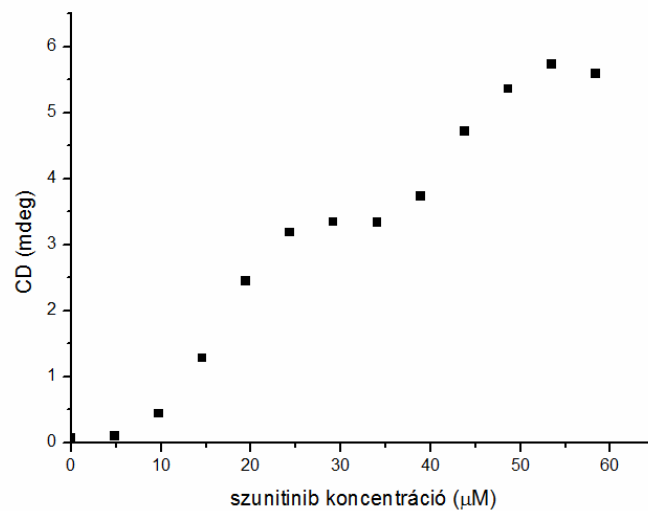


26. ábra: A szunitinib SS DNS-kötődése



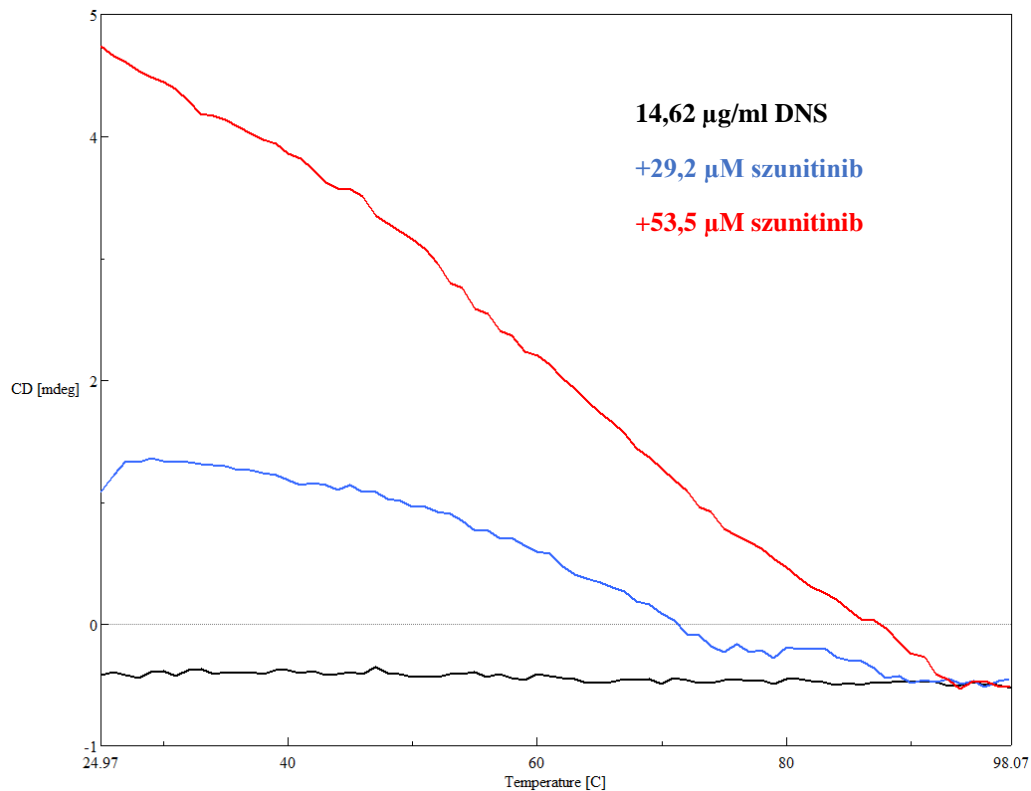
27. ábra: Plazmid DNS titrálása szunitinib bázissal

Ábrázoltuk a 359,2 nm-en mért ICD jel intenzitását a szunitinib koncentráció függvényében. A kapott görbe a 28. ábrán látható.



28. ábra: Az ICD jel intenzitásának változása a szunitinib koncentráció függvényében 359,2 nm-nél

Végeztünk CD-melting méréseket is két szunitinib koncentrációnál. A módszer a DNS esetében a helikális struktúra megszűnéséről nyújt információt. T_m az a hőmérséklet, amikor a polinukleotid 50%-a egyszálú formában van jelen. A mérésekhez a koncentrációkat úgy választottuk meg, hogy a 28. ábrán látható görbe két külön lépcsőfokára essen. A 359 nm-en regisztrált melting görbéket a 29. ábrán tüntettük fel.



29. ábra: Szunitinib CD-melting 359 nm-en

A CD mérések kiegészítéseként végeztünk DF-STD-NMR vizsgálatot is plazmid DNS esetében. Az 1.3.2.3. fejezetben leírt BMI meghatározásával kívántuk igazolni feltételezéseinket. A mérési eredményeket és a számolt értékeket a 8. táblázat foglalja össze.

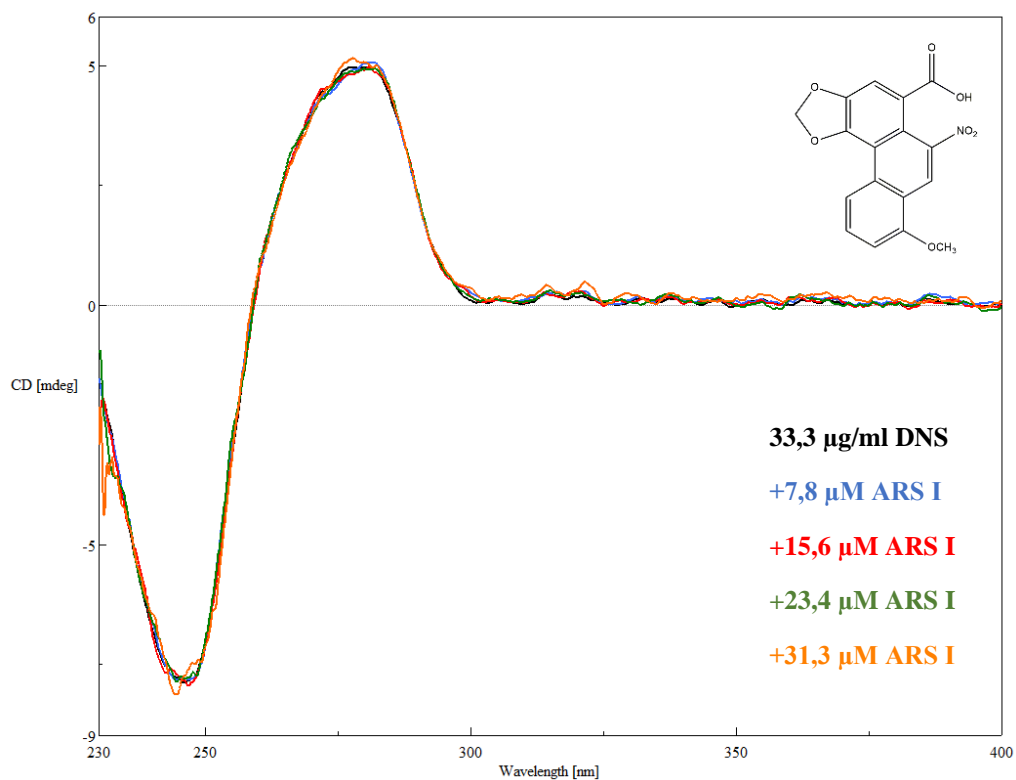
8. táblázat: A szunitinib STD-NMR adatai

csúcs	δ (ppm)	S/N (aromás)	S/N (alifás)	BMI
CH ₃ -etil	1,19	1,11	0,67	1,66
CH ₃	2,20	1,36	1,38	0,98
CH ₃	2,24	1,22	1,36	0,89
CH ₂ -etil	3,16	1,09	1,19	0,91
NH-CH ₂ -CH ₂ -N	3,23	1,04	1,20	0,86
NH-CH ₂ -CH ₂ -N	3,60	0,94	1,11	0,85
4-Ar	6,74	1,26	1,14	1,10
6-Ar	7,14	1,09	1,19	0,92
7-Ar	7,29	1,98	1,32	1,50

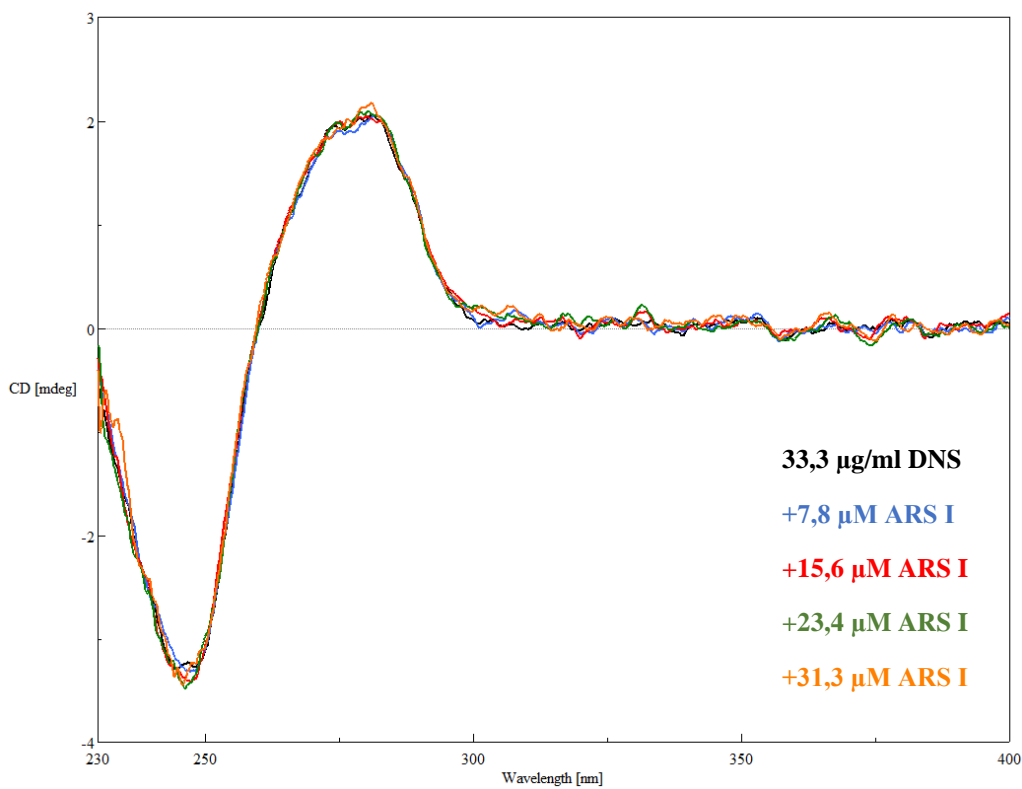
4.1.4. Arisztolochiasav I (ARS I) vizsgálata

Az arisztolochiasav I a különféle arisztolochiasavak közül a legnagyobb mennyiségben előforduló vegyület, amely az *Aristolochiaceae* családba tartozó legtöbb növényben megtalálható. Az *Aristolochia* fajok bizonyos tagjait némely afrikai országokban, mint például Nigéria, Egyiptom vagy Dél-Afrikai Köztársaság gyógynövényként alkalmazzák különféle megbetegedések kezelésére, annak ellenére, hogy az arisztolochiasavakat különböző vesebetegségekkel hozták összefüggésbe[120].

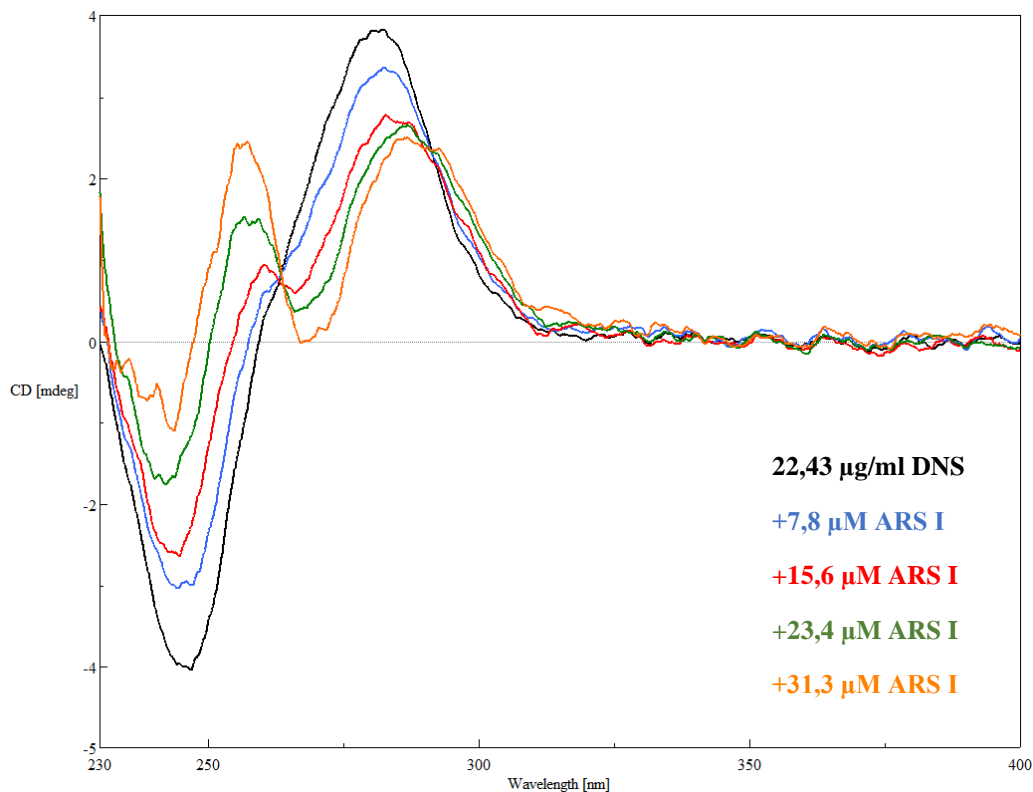
Vizsgáltuk a vegyület DNS-kötődését először két természetes eredetű DNS-en, majd plazmid DNS-en is. A regisztrált spektrumok a 30-32. ábrákon láthatók.



30. ábra: CT DNS titrálása ARS I-gyel



31. ábra: ChE DNS titrálása ARS I-gyel



32. ábra: pUC18 plazmid DNS titrálása ARS I-gyel

4.2. Ciklodextrin (CyD) komplexek vizsgálata

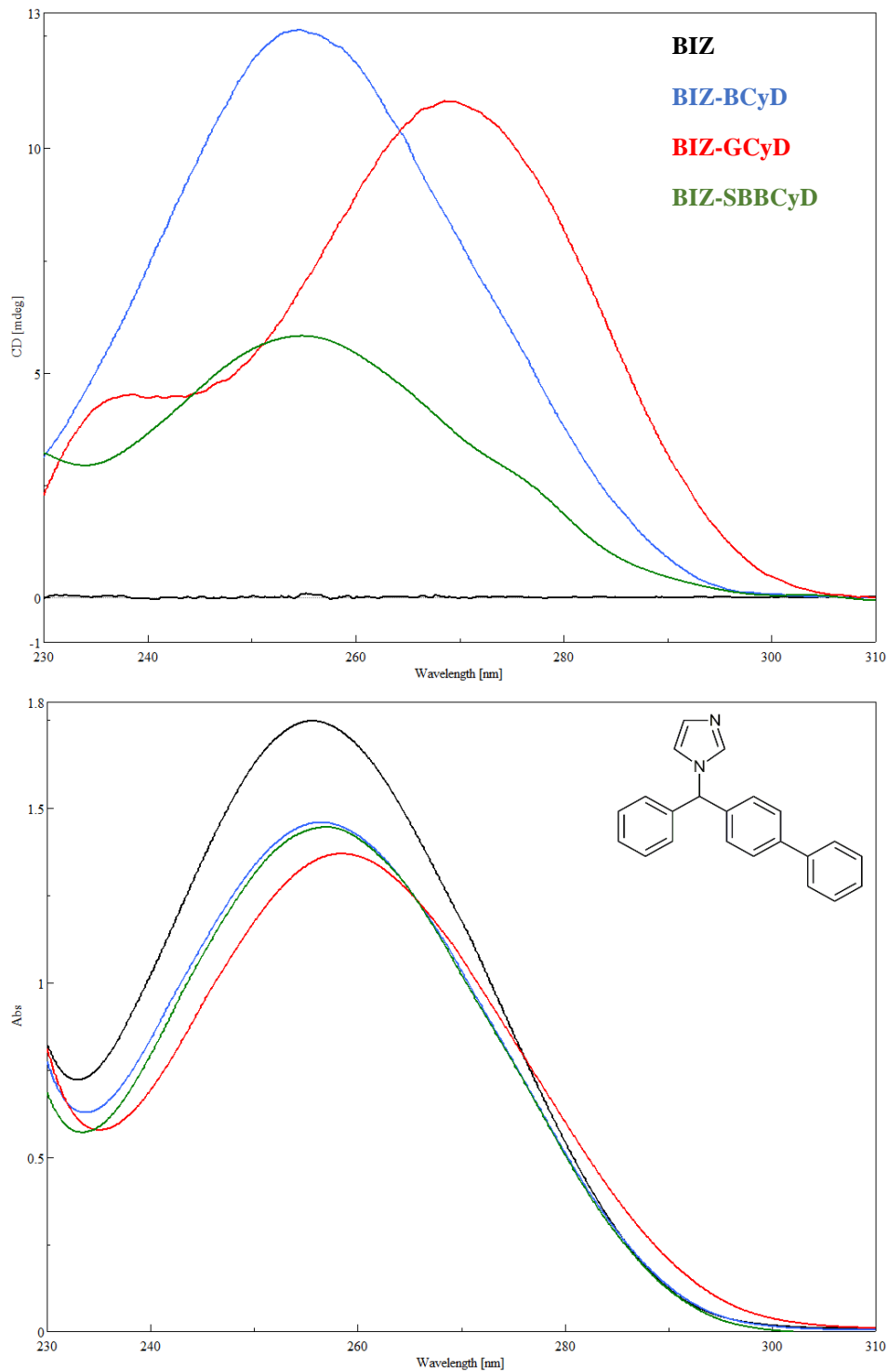
A doktori munka során öt antifungális azol natív és szintetikus CyD-ekkel való komplexképzését vizsgáltuk. Választásunk azért esett ezekre a vegyületekre, mert vízben rosszul oldódnak, illetve pár vegyület már forgalomban van CyD komplexként. Az öt azol közül egy triazol-, a többi imidazol-származék volt. A natív CyD-ek közül mindhárom, az ACyD, a BCyD és a GCyD, szintetikus származékaik közül pedig a CMBCyD, a DMBCyD, a TMBCyD, a SBBCyD, valamint a HPBCyD komplexképzését vizsgáltuk.

4.2.1. Flukonazol (FLZ)

Flukonazol esetében nem detektáltunk ICD jelet semmilyen azol:CyD aránynál.

4.2.2. Bifonazol (BIZ)

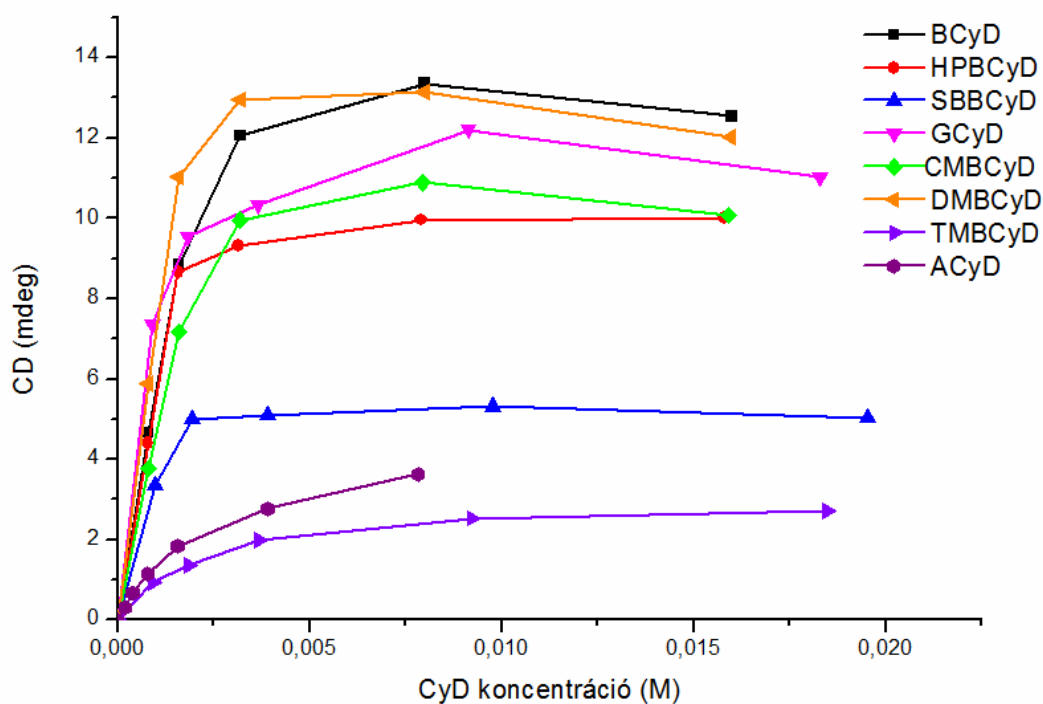
A bifonazol bifenil funkciójának 250 nm környékén rendelkező intenzív aromás sávja miatt a méréseket 0,2 cm-es kvarc küvettát használva végeztük el. Néhány komplex CD és UV spektrumát a 33. ábrán mutatjuk be ötszörös CyD feleslegnél.



33. ábra: BIZ-CyD komplexek CD (fent) és UV (lent) spektrumai ötszörös CyD koncentrációnál

A stabilitási állandó kiszámításához szükségünk volt a különböző CyD koncentrációnál mért ellipticitás értékre. Az értékeket a CD maximum hullámhosszán

olvastuk le és a CyD koncentráció függvényében ábrázoltuk. Az így kapott görbéket a 34. ábrán mutatjuk be.



34. ábra: A BIZ-CyD komplexek mért ellipticitása különböző CyD koncentrációknál

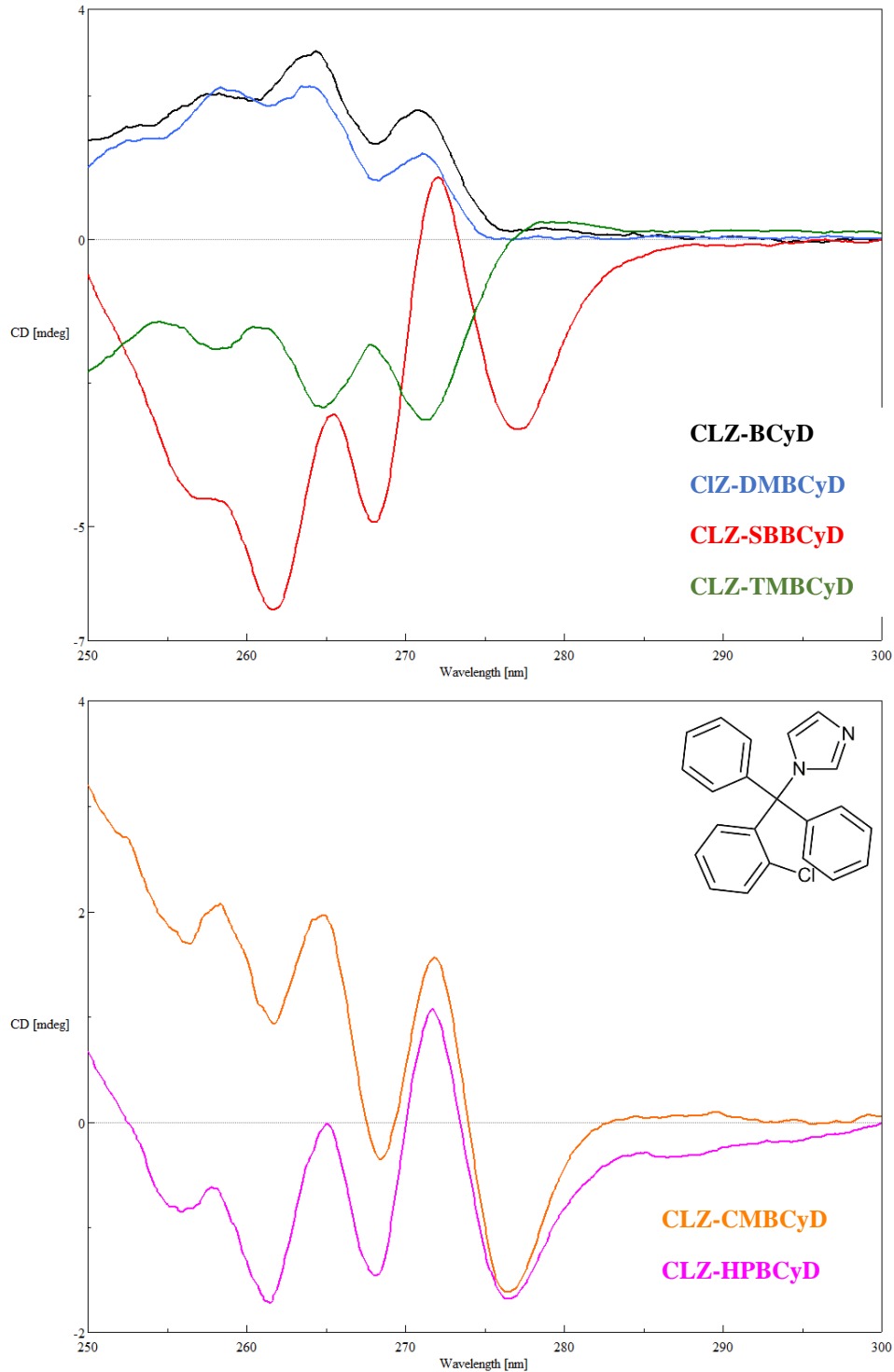
A számolt stabilitási állandókat a különböző BIZ: CyD komplexekre a 9. táblázatban foglaltuk össze. Zárójelben az illesztésre vonatkozó regressziós koefficiens olvasható.

9. táblázat: A BIZ-CyD komplexek számolt stabilitási állandói és regressziós koefficiensei

CyD	$\log K_{1:1} (M^{-1})$	R^2
ACyD	2,74	0,9966
BCyD	3,40	0,9964
GCyD	4,04	0,9636
DMBCyD	4,21	0,9986
TMBCyD	2,95	0,9975
CMBCyD	3,40	0,9950
HPBCyD	4,46	0,9957
SBBCyD	4,72	0,9962

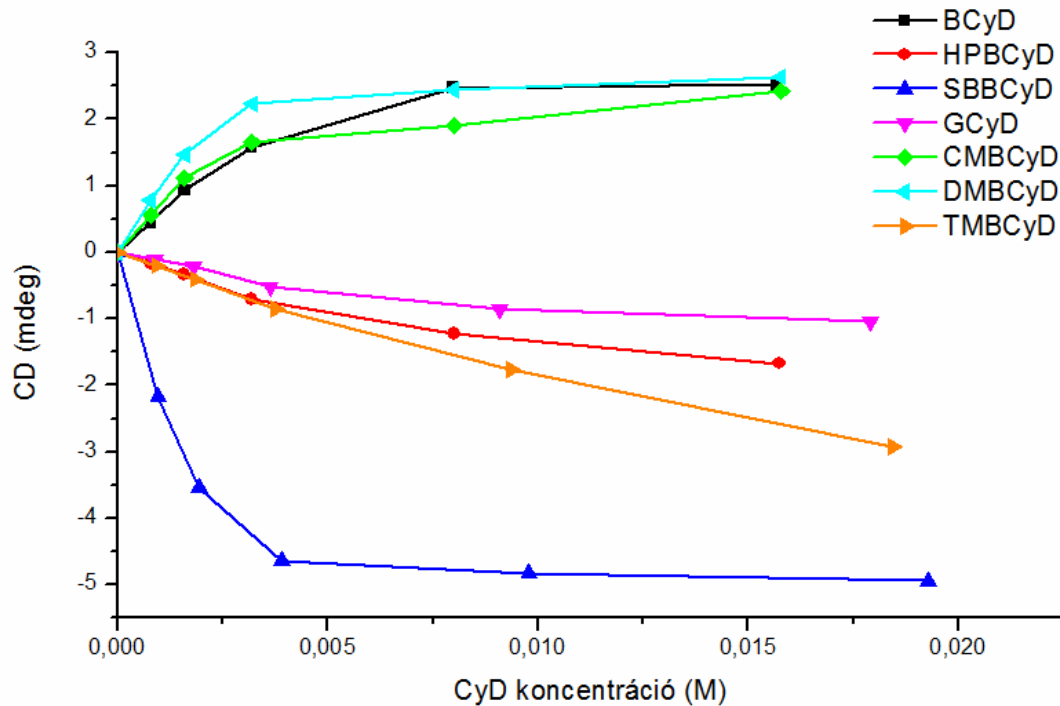
4.2.3. Klotrimazol (CLZ)

Klotrimazol esetében is elvégeztük a komplexképzést a CyD-ekkel, akárcsak a BIZ esetében. Néhány komplex jellegzetes CD spektrumát a 35. ábra mutatja be tízszeres CyD feleslegnél.



35. ábra: CLZ-CyD komplexek CD spektrumai tízszeres CyD koncentrációnál

A nemlineáris paraméterillesztéshez szükséges adatokat a spektrumokról az adott komplex maximumának vagy minimumának hullámhosszánál olvastuk le. A 36. ábrán látható a leolvasott CD jel CyD koncentráció függvényében ábrázolva.



36. ábra: A CLZ-CyD komplexek mért ellipticitása különböző CyD koncentrációknál

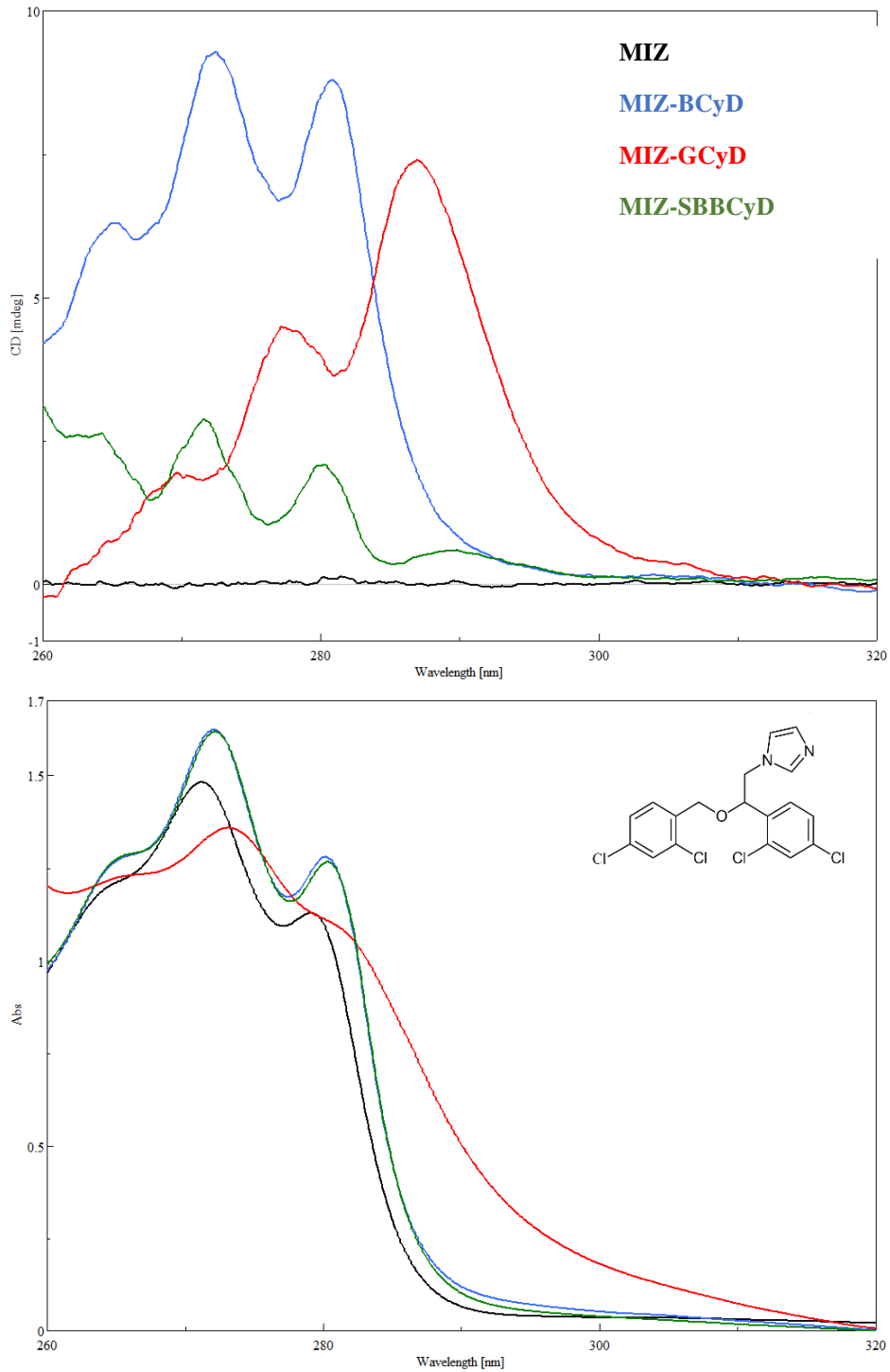
A számított stabilitási állandók a 10. táblázatban kerültek összefoglalásra, az illesztés regressziós koefficienseivel egyetemben.

10. táblázat: A CLZ-CyD komplexek számolt stabilitási állandói és regressziós koefficiensei

CyD	$\log K_{1:1} (M^{-1})$	R^2
ACyD	-	-
BCyD	2,65	0,9861
GCyD	-	-
DMBCyD	3,23	0,9924
TMBCyD	1,48	0,9996
CMBCyD	2,91	0,9802
HPBCyD	2,09	0,9966
SBBCyD	3,47	0,9972

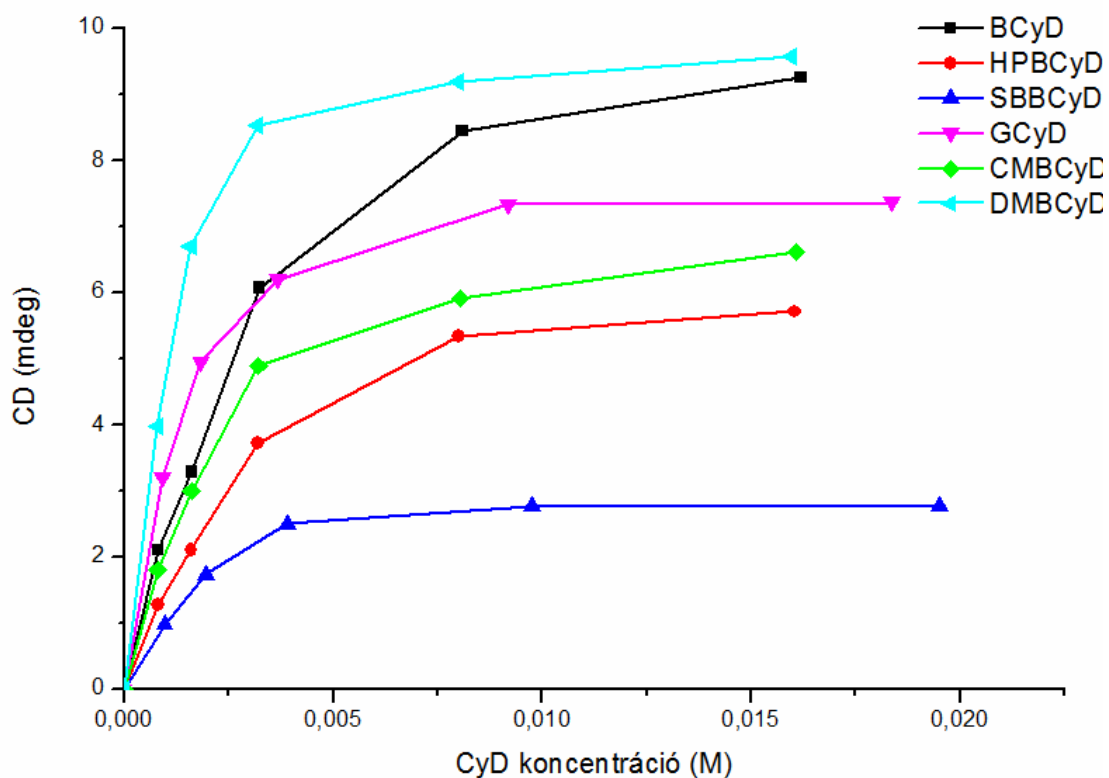
4.2.4. Mikonazol (MIZ)

A mikonazol esetében is sikerült jól mérhető ICD jelet detektálni. Néhány képződött komplex CD és UV spektrumát a 37. ábrán tüntettük fel tízszeres CyD feleslegnél.



37. ábra: MIZ-CyD komplexek CD (fent) és UV (lent) spektrumai tízszeres CyD koncentrációnál

Akárcsak a korábban tárgyalt két vegyület esetében, itt is elvégeztük a koncentráció-CD adatpárokra a paraméterillesztést. Az illesztett görbék a 38. ábrán láthatók, az ezekből számolt stabilitási állandókat pedig a 11. táblázatban foglaltuk össze.



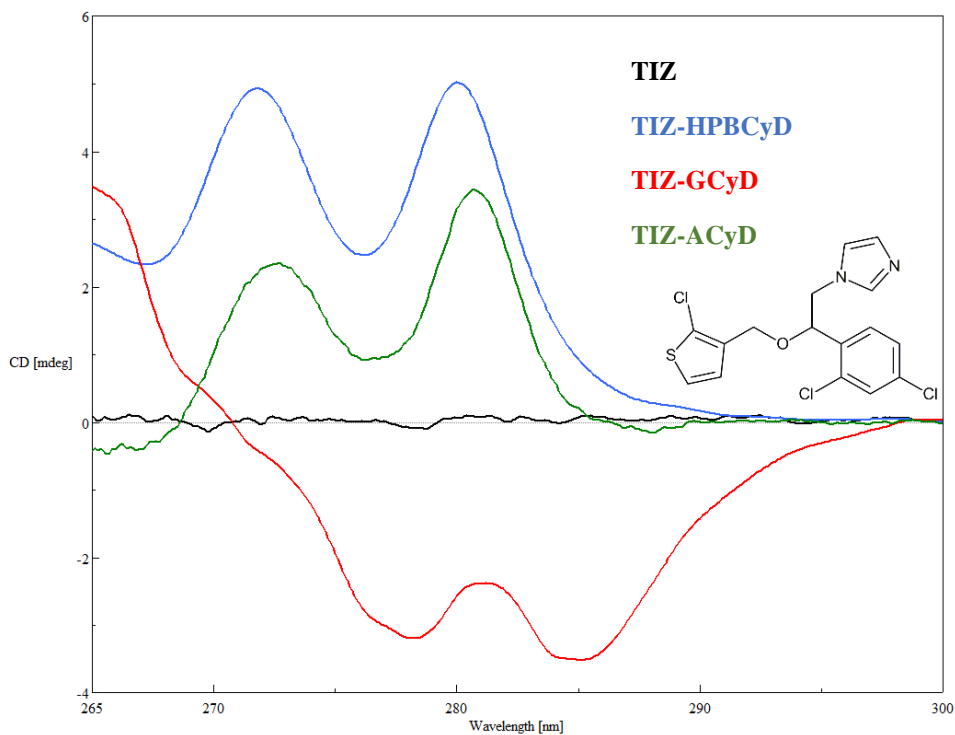
38. ábra: A MIZ-CyD komplexek mért ellipticitása különböző CyD koncentrációknál

11. táblázat: A MIZ-CyD komplexek számolt stabilitási állandói és regressziós koefficiensei

CyD	$\log K_{1:1} (M^{-1})$	R^2
ACyD	-	-
BCyD	2,70	0,9943
GCyD	3,37	0,9969
DMBCyD	3,68	0,9995
TMBCyD	-	-
CMBCyD	2,96	0,9963
HPBCyD	2,71	0,9949
SBBCyD	3,18	0,9925

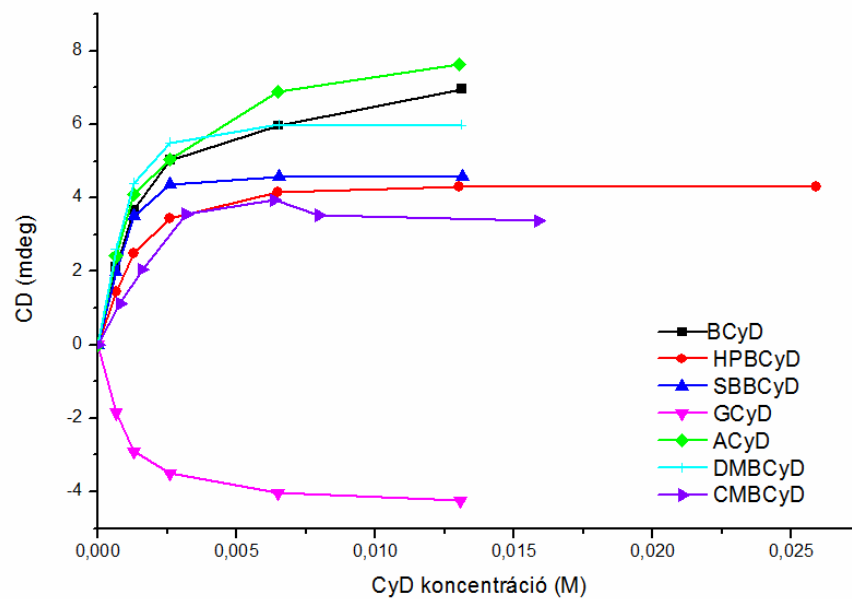
4.2.5. Tiokonazol (TIZ)

Utolsó vizsgált azolunk, a tiokonazol volt. A 39. ábrán néhány komplex jellegzetes ICD spektruma látható kétszeres CyD koncentrációnál.



39. ábra: TIZ-CyD komplexek CD spektrumai kétszeres CyD koncentrációnál

Ismételten ábrázoltuk a mért CD jelet a CyD koncentráció függvényében (40. ábra), majd az adatokból kiszámítottuk a stabilitási állandókat (12. táblázat).



40. ábra: A TIZ-CyD komplexek mért ellipticitása különböző CyD koncentrációknál

12. táblázat: A TIZ-CyD komplexek számolt stabilitási állandói és regressziós koefficiensei

CyD	$\log K_{1:1}$ (M^{-1})	R^2
ACyD	3,12	0,9877
BCyD	3,18	0,9925
GCyD	3,71	0,9921
DMBCyD	3,86	0,9997
TMBCyD	-	-
CMBCyD	2,85	0,9783
HPBCyD	3,30	0,9998
SBBCyD	3,97	0,9996

A 13. táblázatban összefoglaltuk az általunk számolt stabilitási állandókat az irodalomban már fellelhető adatokkal, zárójelben megnevezve a módszert, amivel ezeket meghatározták (PSS: fázisoldhatósági vizsgálat).

13. táblázat: Az antifungális azolok CyD komplexéinek számolt stabilitási állandói összevetve az irodalmikkal

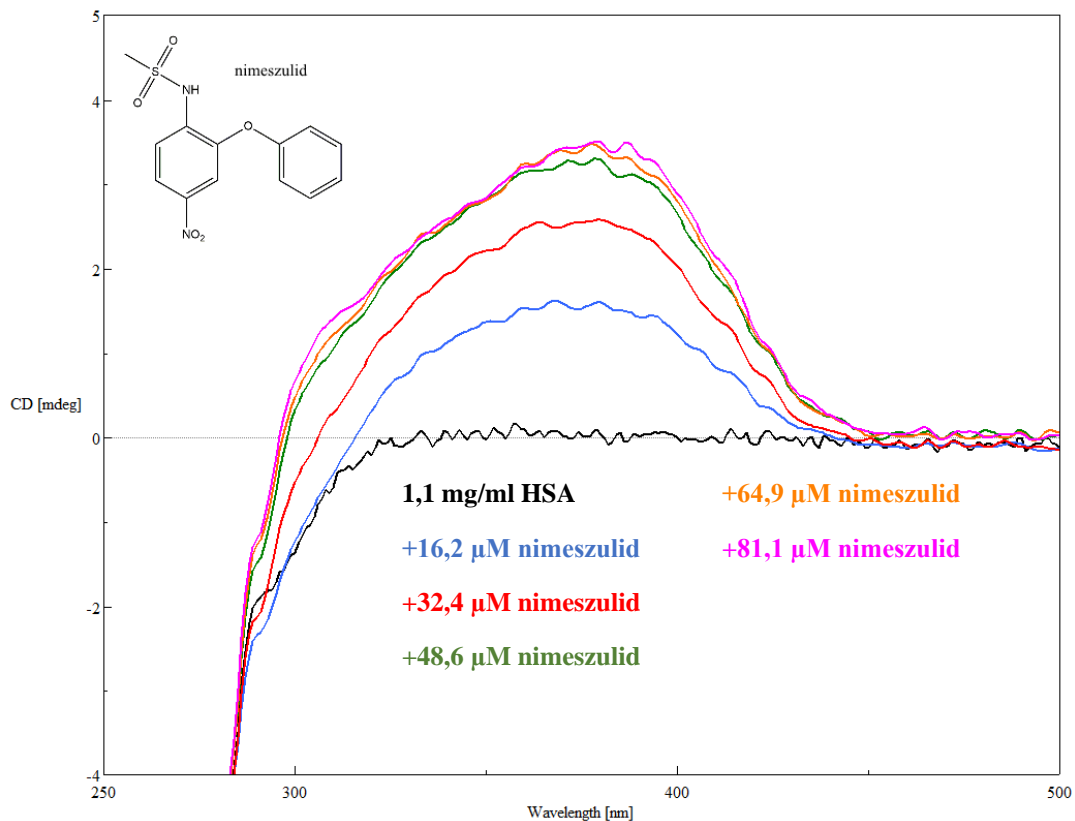
Vegyület		GCyD	CMBCyD	SBBCyD	HPBCyD	TMBCyD	DMBCyD	BCyD	ACyD
FLZ	számolt	-	-	-	-	-	-	-	-
	irodalmi	-	-	1,90[99] (NMR)	1,13[99] (NMR)	-	-	1,03[99] (NMR)	-
BIF	számolt	4,04	3,40	4,72	4,46	2,95	4,21	3,40	2,74
	irodalmi	6,45 (1:2)[124] (NMR)	-	3,94[124] (NMR)	3,66[124] (NMR)	3,13- 3,26[121] (CE)	-	3,34- 3,52[121] (CE)	-
CLZ	számolt	-	2,91	3,47	2,09	1,48	3,23	2,65	-
	irodalmi	3,04[128] (PSS)	-	-	2,65[125] (PSS)	-	-	2,66[122] (PSS)	-
MIZ	számolt	3,37	2,96	3,18	2,71	-	3,68	2,70	-
	irodalmi	-	-	-	2,56[126] (PSS) 2,41[127] (PSS)	-	-	2,91[122] (PSS)	-
TIZ	számolt	3,71	2,85	3,97	3,30	-	3,86	3,18	3,12
	irodalmi	-	-	-	2,86[123] (CE)	-	3,84[123] (CE)	3,12[123] (CE)	-

4.3. Fehérjekötődési vizsgálatok

4.3.1. Nimeszulid HSA-kötődésének vizsgálata

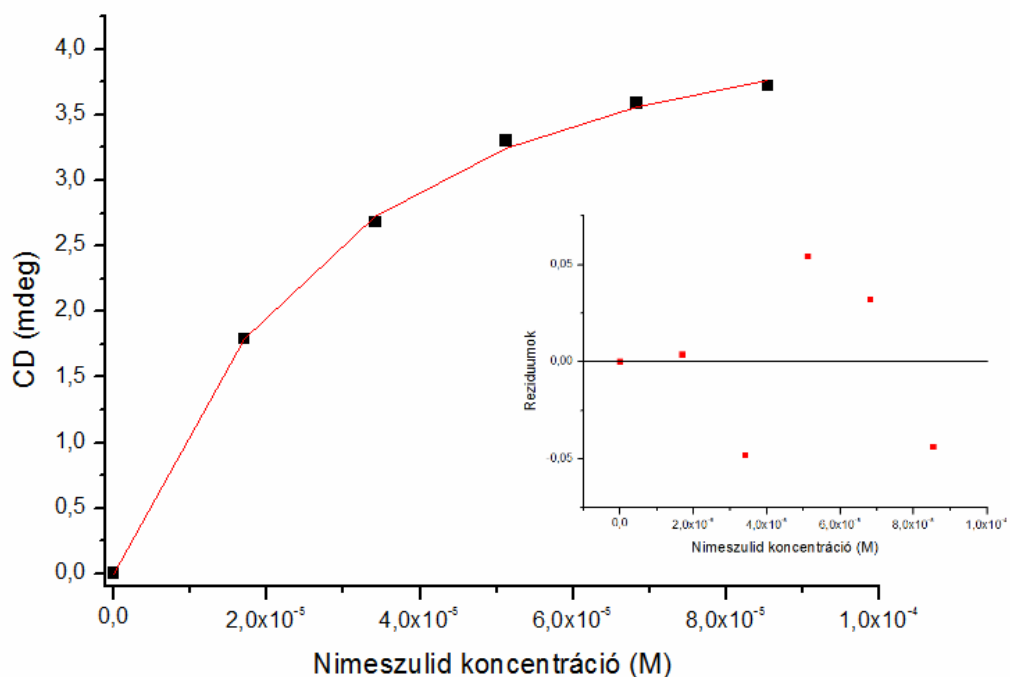
A HSA egy 66,5 kDa molekulatömegű fehérje, amely két savas kötőhellyel rendelkezik, így képes lehet a savas karakterű nimeszulid megkötésére. Ezt a kötődést vizsgáltuk CD spektroszkópiával, a regisztrált spektrumsorozat a 41. ábrán látható.

A nimeszulid fehérjekötődése igen könnyen vizsgálható, mert az aromás gyűrűhöz kapcsolódó csoportok következtében 300 nm fölött is rendelkezik fényabszorpcióval. A regisztrált ICD jel ebben az esetben is a kialakult komplexre szelektív.



41. ábra: HSA titrálása nimeszuliddal

Megvizsgáltuk, hogy a nimeszulid koncentráció függvényében, állandó fehérjekoncentráció mellett hogyan változik az ICD jel. Az összefüggés a 42. ábrán látható.



42. ábra: A mért ICD jel a nimeszulid koncentráció függvényében 377 nm-en

A kapott spektrumsorozatot felhasználva, az antifungális azolok esetében is alkalmazott nemlineáris paraméterillesztéssel számoltunk kötődési állandót a nimeszulidra. A három párhuzamos mérésből számított adatokat a 14. táblázat foglalja össze.

14. táblázat: A nimeszulid-HSA komplex számolt $\log K$ (M^{-1}) értékei és regressziós koefficiensei

I. mérés	4,63	0,9971
II. mérés	4,75	0,9959
III. mérés	4,71	0,9990
Átlag	4,70±0,06	

5. Megbeszélés

5.1. DNS vizsgálatok

5.1.1. pUC18 plazmid DNS felhasználhatóságának validálása

Összehasonlítva a 13. ábrán feltüntetett plazmid CD spektrumát a 14. ábrán látható természetes eredetű DNS-ek spektrumával, láthatóvá válik, hogy nincs jelentős különbség közöttük. A sávok maximumai, illetve minimumai néhány nm eltéréssel ugyanazoknál a hullámhosszoknál találhatók. A megfelelő hullámhosszak a 15. táblázatban kerültek összefoglalásra.

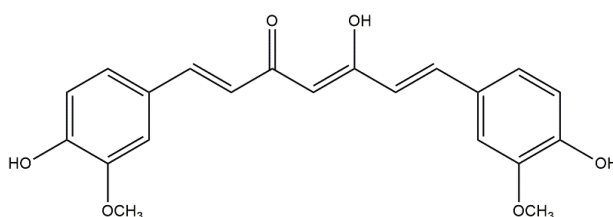
15. táblázat: A felhasznált DNS sávok minimumainak (-) és maximumainak (+) helyei

	(-)	(+)	(-)	(+)
pUC18	209,1 nm	211,1 nm	246,5 nm	275,4 nm
ChE	208,6 nm	218,6 nm	247,8 nm	276,6 nm
SS	209,8 nm	218,4 nm	247,6 nm	277,6 nm
CT	210,0 nm	218,4 nm	247,6 nm	276,6 nm

A 15. és 16. ábrán látható a kétféle DNS esetében regisztrált spektrumsorozat EtBr-dal való titrálás esetén a 17. és 18. ábra pedig a berenillel történő titrálási sorozat eredményeit mutatja be. Összevetve a megfelelő spektrumokat, láthatóvá válik, hogy az ICD alakja mindkét DNS esetében ugyanolyan. Jelentősebb különbség egyedül a 276 nm körül megjelenő pozitív sáv változásaiban jelenik meg, amely feltehetően arra vezethető vissza, hogy a plazmid DNS cirkuláris szerkezettel rendelkezik.

5.1.2. Kurkumin és kurkuminoidok vizsgálata

A kurkumin szerkezeti képlete a 43. ábrán látható. Szerkezetét tekintve a polifenolok közé tartozik, a konjugált kettőskötés rendszer következtében a vegyület sárga színű. A molekulának két tautomer formája létezik, a keto- és az enol-forma.

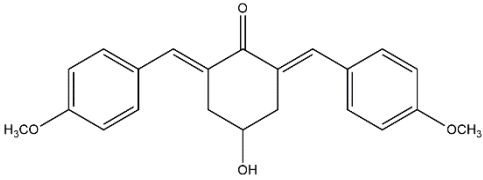
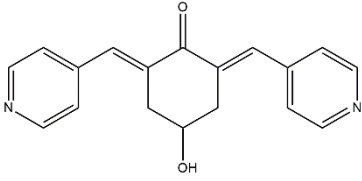
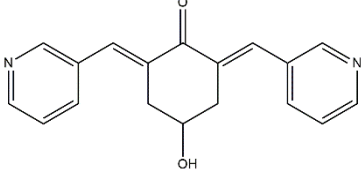
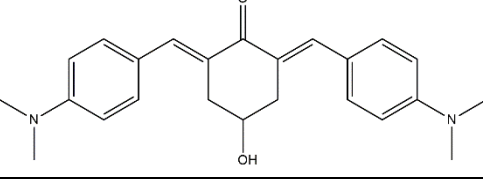
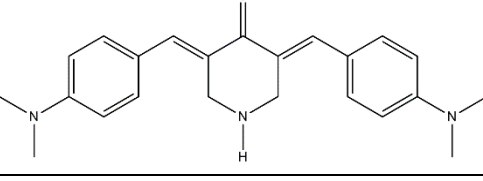


43. ábra: A kurkumin szerkezeti képlete (enol-forma)

A kurkumin abszorpciós sávjának tartományában egy igen nagy intenzitású ICD jel látható, amely egyértelműen utal a DNS kötődésre. A vegyület szerkezete és a regisztrált jel alapján az volt a feltételezésünk, hogy a molekula a polinukleotid lánc kisárákába kötődik. Ez az elmélet megegyezik az irodalomban fellelhető adatokkal[129].

Az 5 vegyület szerkezetét, ahol tudtunk DNS-kötődést kimutatni a 16. táblázat foglalja össze. A többi struktúra a feltüntetett vegyületekhez képest a ciklohexanon gyűrű 4-es pozíciójában, illetve a benzilidén gyűrű 4' pozíciójában tartalmazott módosításokat.

16. táblázat: A vizsgált kurkuminoidok szerkezete, molekulatömege és törzsoldat koncentrációja

Sorszám	Szerkezeti képlet	Sorszám	Törzsoldat koncentrációja (mM)
		Molekulatömeg (g/mol)	
1		HIBR-9	5,14
		350,4	
2		HIBR-26	10,26
		292,3	
3		HIBR-27	9,92
		292,3	
4		HIBR-44	10,09
		376,5	
5		HIT-205	4,98
		361,5	

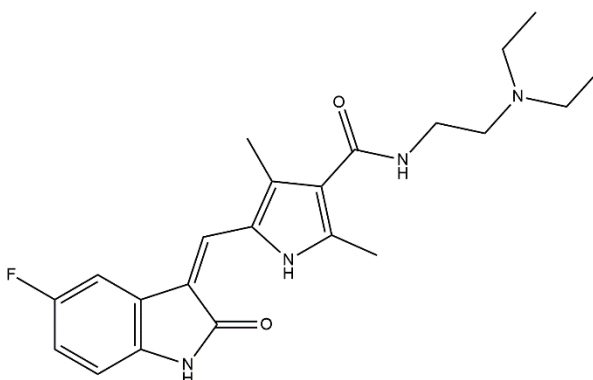
A 2-5. vegyületek szerkezetének közös jellemvonásai a ciklohexanon gyűrű 4-es helyzetében lévő vagy ahhoz kapcsolódó heteroatom (N vagy O), amelynek egyik szubsztituense hidrogénatom, illetve a benzilidén gyűrűben található vagy ahhoz kapcsolódó nitrogén. A HIBR-26 és a HIBR-27 szerkezete mindössze a piridin gyűrűben lévő nitrogénatomok helyzetében különbözik, de CD spektrumuk között látható némi eltérés: HIBR-26 esetén a koncentráció növekedésével erősen megugrik az ICD jel nagysága, míg HIBR-27 esetén ez nem tapasztalható, az ICD jel gyakorlatilag ugyanakkora marad. Utóbbi esetben feltételezhető, hogy elértük a telítési koncentrációt, azonban az ICD jel előnytelen jel/zaj viszonya miatt ezt nem lehet teljes bizonyossággal kijelenteni. Az előnytelen jel/zaj viszony oka ebben az esetben, a magas fényabszorpció, de az alacsony ICD jelintenzitás is hátrányosan befolyásolja.

Eltérő esetet képvisel a HIBR-9-cel jelzett molekula. Bár szerkezetében nem található N atom az oldalláncban, ennek ellenére mégis értékelhető ICD couplet-et kaptunk a mérések során. A couplet jel miatt felvettük a szabad molekula CD spektrumát, mert a couplet létrejöttének egyik oka a molekula önasszociációja is lehet. Azt tapasztaltuk, hogy bár nem királis a molekula, mégis detektálható egy gyenge ICD couplet jel, amely feltehetőleg oxo-hidroxi asszociáció következménye. Összevetve a DNS-t nem tartalmazó molekula, valamint a DNS-molekula komplex CD spektrumait, láthatóvá válik, hogy a két ICD jel között jelentős eltérés van, így ez a vegyület asszociátumként is képes a DNS-hez kötődni. HIBR-44 esetén szintén ICD couplet-et detektáltunk, itt azonban a molekula saját spektrumának nem volt ICD jele, így itt maga a monomer molekula kötődik a makromolekulához.

A kapott adatok alapján feltételezhető, hogy a kötődés a molekulákban lévő heteroatomok és a DNS-lánc között kialakuló hidrogénhid kölcsönhatások eredménye. Ezen felül látható, hogy a DNS sávok jelentős változást nem szenvednek, a polinukleotid a natív B-forma állapotában marad. Az ICD jel alacsony intenzitása és a szerkezet alapján (a középső gyűrű konformációs szabadsága miatt nem biztos, hogy illeszkedni tud a kisárokba) feltételezésünk, hogy a molekulák aspecifikusan kívülről kötődnek a polinukleotid cukorfoszfát láncához.

5.1.3. Szunitinib vizsgálata

A szunitinib szerkezetében (44. ábra) jelenlévő terciér amino-csoport és a planáris heteroaromás szerkezet miatt szeretnénk volna tesztelni a szunitinib bázis DNS-hez való kötődését. Először a három természetes eredetű DNS-en vizsgáltuk, hogy kimutatható-e bármiféle kölcsönhatás a makromolekulával. Mindhárom DNS esetén tudunk kölcsönhatást kimutatni – a ChE DNS esetén kapott spektrumot a 25. ábra, a SS DNS esetén kapott spektrumot pedig a 26. ábra mutatja be – azonban a két nagyobb molekulatömeggel rendelkező DNS (ChE, CT) esetén már alacsony ligandum koncentrációnál is oldhatósági problémákba ütköztünk, sárgás vagy sárgásfehér anyag csapódott ki a küvettában.



44. ábra: A szunitinib szerkezeti képlete

Ezután kezdtük meg a plazmid DNS-sel való kísérleteket. A tisztított makromolekulát tartalmazó törzsoldatból az optimális bemérés 70 μ l-nek adódott, amelyet még 2,5 ml desztillált víz hozzáadásával hígítottunk tovább. A végtérfogatban a DNS koncentrációt a CD spektrummal párhuzamosan felvett UV spektrum alapján határoztuk meg. Ennek alapja, hogy egy 50 μ g/ml koncentrációjú DNS oldat esetében a mért abszorbancia értéke 1. Ez alapján a titrálásaink során a plazmid koncentráció 14,62 μ g/ml-nek adódott. A ligandumot 12,5 nmol-onként növekvő mennyiségben adtuk az oldathoz. A regisztrált spektrumok egy része a 27. ábrán látható. Megvizsgálva a spektrumok lefutását, kétféle ICD jelet tudunk megfigyelni: alacsonyabb koncentrációknál (~30 μ M-ig) egy viszonylag alacsony intenzitású, ellaposodó ICD görbe látható, míg a koncentráció emelésével (30 μ M felett) megjelenik egy ennél nagyobb intenzitással rendelkező ICD couplet. Az ICD jel ilyesfajta kettőssége

önmagában is utal arra, hogy a molekula a koncentráció függvényében kétféle kötődési módot mutat a plazmid DNS-hez. Szintén erre utaló jel a spektrumokban az izoelliptikus pont hiánya. Eltérés a természetes DNS-ek esetén felvett spektrumoktól, hogy ezeknél hiányzik az ICD couplet megjelenése előtti ellaposodó ICD jel. Feltételezhető, hogy ez az eltérés a DNS-ek szerkezetében lévő különbség eredménye.

A 28. ábrán feltüntetett grafikonon látható, hogy $\sim 20 \mu\text{M}$ koncentrációnál megjelenik egy plató szakasz, azonban a koncentráció további növelésére ez megszűnik, az ICD jel ismét növekedni kezd, míg elér egy második plató szakaszt. Ez a tapasztalat szintén a kettős kötődési módot támasztja alá.

A 29. ábrán láthatóak a 359 nm-en rögzített CD-melting görbék 29,2 és 53,5 μM szunitinib koncentrációnál. A spektrumokból azt lehet leolvasni, hogy a hőmérséklet emelésével a két ligandumot tartalmazó oldat CD jelintenzitása egyenlővé válik a ligandumot nem tartalmazó mintáéval, ebből következően a molekula csak az intakt kettős hélixű DNS molekulához képes kapcsolódni, egyszálú molekulához nem, ilyenkor szétesik a komplex.

A kettős kötődési mód további igazolására DF-STD-NMR méréseket is végeztünk. A módszer validálására elsőként az irodalomban leírt referencia anyagokra számítottunk BMI értékeket, hogy megvizsgáljuk a reprodukálhatóságot a pUC18 plazmid DNS-en. A kapott értékek jó egyezést mutattak az irodalomban leírtakkal[97]:

- doxorubicin
 - mért: 1,30 és 0,26
 - irodalmi: 1,33 és 0,2
- netropszin
 - mért 0,98
 - irodalmi: 0,90
- EtBr
 - mért: 0,93
 - irodalmi: 0,90.

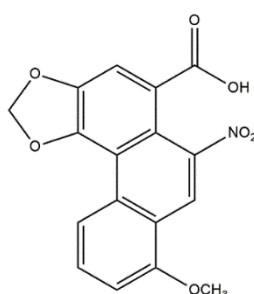
Ezután a mérésorozatot elvégeztük a szunitinibbel is. Az STD-NMR mérésekből számolt BMI adatokat a 8. táblázat foglalja össze a szunitinib protonjaira nézve. Ezek alapján szunitinib esetében a BMI értéke $1,1 \pm 0,3$ -nak adódott, amely az interkalációra és

a kisárok kötődésre jellemző értékek határán mozog. Ez további bizonyítéka lehet annak, hogy a szunitinib kettős kötődési módot mutat a felhasznált plazmid DNS-hez.

A fentiek alapján az a feltevésünk, hogy a szunitinib két lépésben kapcsolódik a cirkuláris szerkezetű pUC18 plazmid DNS-hez. Első lépésben a vegyület oldalláncában található protonált nitrogén atom elektrosztatikus kölcsönhatás létrehozása által kapcsolódik a DNS foszfát gerincéhez, az aromás gyűrűrendszer pedig a molekula kisárába kötődik. Ennek eredményeként a plazmid szuperhélice kitekeredik, második lépésként pedig a ligandum interkalációja zajlik le.

5.1.4. Arisztolochiasav I (ARS I) vizsgálata

Az arisztolochiasav I szerkezeti képlete a 45. ábrán látható. A planáris triciklusos aromás gyűrűrendszer, illetve a rajta található nitro-csoport igen erős indikátora egy lehetséges DNS-kötődésnek.

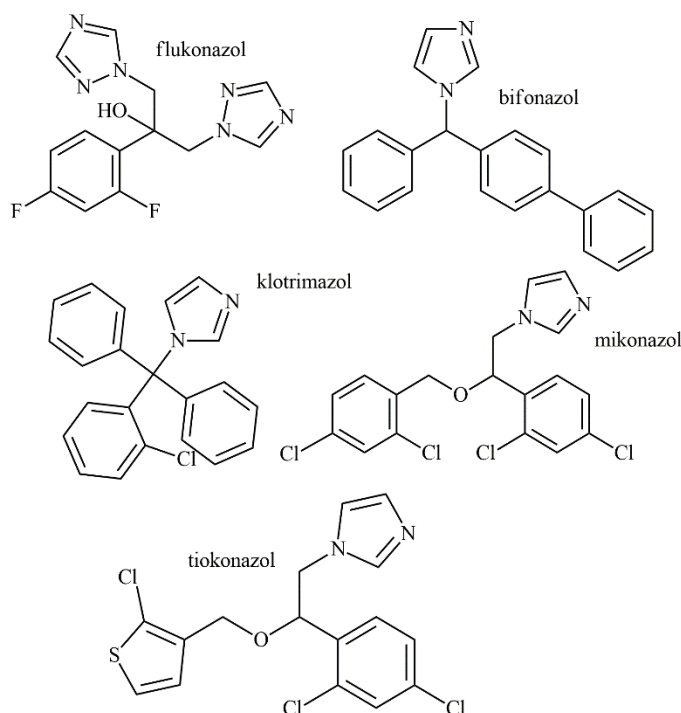


45. ábra: Az ARS I szerkezeti képlete

Első lépésként ebben az esetben is a természetes eredetű DNS-sel való kölcsönhatást vizsgáltuk. Látható, hogy sem a CT, sem pedig a ChE DNS esetében nem tapasztaltunk változást a spektrumokban (30-31. ábrák). ICD jel nem jelent meg és maguk a DNS sávok is érintetlenek maradtak a vizsgált koncentrációtartományban. Ezzel szemben a plazmid DNS esetében már tudtunk kötődést kimutatni (32. ábra). Érdekesség, hogy ICD jel ebben az esetben sem jelent meg a spektrumokon, azonban a DNS sávok torzultak: a pozitív sáv és a negatív sáv intenzitása is változott, ezen felül előbbi még batokróm eltolódást is mutatott, illetve a negatív sáv mellett egy új pozitív jelent meg. A spektrumban megjelenő két izoelliptikus pont (263,4 nm és 291 nm) egyértelmű utalás arra, hogy ebben az esetben csak egyféle kötődési módról van szó. Feltételezéseink szerint a molekula a plazmid DNS szuperhélix szerkezetében okoz változásokat.

5.2. Ciklodextrin (CyD) komplexek vizsgálata

A vizsgált antifungális azolok szerkezete a 46. ábrán került összefoglalásra. Szerkezetüket tekintve a FLZ triazol, míg a másik négy vegyület imidazol származék. A BIF, a MIZ és a TIZ rendelkeznek királis szénatommal, ezeket a vegyületeket racém elegyként használtuk a mérések során és a gyógyszerkönyvekben (Ph. Hg. VIII. és Ph. Eur. 10.2) is ilyen formában hivatalosak.



46. ábra: A vizsgált gombaellenes azolok szerkezeti képletei

Az antifungális azolokból 0,1M koncentrációjú törzsoldatokat készítettünk DMSO-dal, amelyeket a kísérletek során tovább hígítottunk, így a végső koncentráció 0,0016M lett. A CyD-ekből desztillált vízzel 0,016M-os törzsoldat készült. A mérésekhez a következő CyD:azol koncentrációarányokban készültek az oldatok: 0:1; 0,5:1, 1:1, 2:1, 5:1, 10:1. Egyes vizsgálatokhoz készültek továbbá 20:1, illetve 50:1 arányú oldatok is, ilyenkor a CyD-t közvetlen bemeréssel adtuk az azolokhoz. Az azolok oldhatóságának elősegítésére a pH-t 2 körülire állítottuk be 5 µl 2M-os HCl felhasználásával.

A vegyületek vizsgálata során ICD jelet abban az esetben kaptunk, amennyiben létrejött a komplexképzés. Önmagában se a CyD-ek, se az azolok nem szolgáltatnak CD

jelet, mert a CyD-ek bár királisak, de nem rendelkeznek kromofór csoporttal, az azolok pedig vagy akirálisak vagy racém elegyként kerültek felhasználásra.

A felhasznált azolok néhány fizikai-kémiai paraméterét, amely a továbbiakban az egyes komplexek értékelésénél jelentőséggel bír, a 17. táblázat foglalja össze. (PSA: poláris molekulafelszín, $\log P$: oktanol/víz rendszerre vonatkoztatott megoszlási hányados logaritmus).

17. táblázat: A felhasznált azolok fizikai-kémiai paraméterei

Azol	PSA (\AA^2)[130]	$\log P$
FLU	81,65	0,41[131]
BIF	17,82	4,77[132]
CLZ	17,82	5,20[132]
MIZ	27,05	4,50[133]
TIZ	27,05	5,12[132]

5.2.1. Flukonazol (FLZ)

A flukonazol vizsgálata során nem regisztráltunk ICD spektrumot. Ennek oka feltehetően a vegyület alacsony lipofilitása és magas PSA értéke (17. táblázat), valamint az irodalomban korábban leírt alacsony stabilitási állandó érték. NMR spektroszkópiásan mérve a protonált flukonazol BCyD-nel képzett komplexének $\log K$ értéke 1,03 volt[99].

5.2.2. Bifonazol (BIZ)

Kísérleteink során ACyD esetén már ötszörös és tízszeres CyD feleslegnél is anyagkiválás történt, így a stabilitási állandó meghatározása kevesebb adatpontból valósult meg és ezért kevésbé megbízható. BCyD, DMBCyD, GCyD és CMBCyD esetén a kezdeti ellipticitás maximum elérése után az ICD jel intenzitása csökkenni kezdett, amely arra utal, hogy az 1:1 arányú komplexen kívül más összetételű komplex is keletkezik megfelelően magas CyD feleslegnél (34. ábra). Ennek következtében a stabilitási állandók számolásánál az utolsó adatpontot figyelmen kívül hagytuk. A vegyület szerkezete alapján, a fenil- és a bifenil-csoport egyaránt részt vehet a komplexképzésben.

A 33. ábrán látható a BIZ-BCyD, a BIZ-GCyD és a BIZ-SBBCyD komplexek CD és UV spektruma ötszörös CyD felesleg esetén. Látható, hogy a GCyD spektrum erősbetokróm eltolódást mutat a másik két CyD spektrumához képest, illetve megjelenik egy

kisebb csúcs 235 nm-nél. Az eltolódás arra utal, hogy a bifenil kromofór nem párhuzamos a CyD tengelyével, aminek az eredményeként a fenil-csoport egy része is bekerül az üregbe. Bár a BCyD és a SBBCyD UV spektruma gyakorlatilag megegyezik egymással, ICD spektrumuk jelentős eltérést mutat. Az ICD spektrumok különbsége alapján feltételezhető a komplexek geometriájának és stabilitásának különbsége. SBBCyD esetében az ionos kötés befolyásolja a bifonazol bemerülését a CyD üregébe, emiatt lesz más a spektrum.

A 34. ábrán lévő görbék lefutása alapján azt vártuk, hogy a BCyD és a CMBCyD komplex stabilitási állandói közeli értékek lesznek, mivel kezdeti meredekségük egybe esik. A legnagyobb stabilitási állandót a BIZ-SBBCyD komplexre számítottunk, amelynek oka a negatívan töltött szulfobutil oldallánc és a bifonazol imidazol gyűrűjének savas pH-n protonált nitrogénje között létrejövő ionos kölcsönhatás. A bifonazol komplexek számolt stabilitási állandóit a 9. táblázat foglalja össze.

5.2.3. Klotrimazol (CLZ)

A CLZ PSA értéke ugyanakkora, mint a BIZ-é, ellenben lipofilitása magasabb (17. táblázat) a klórfenil-csoportnak köszönhetően. Ezen paraméterek alapján a stabilitási állandók értékét a BIZ-éhoz hasonlónak vártuk, a komplex geometriáját viszont eltérőnek. A molekula szerkezetét megfigyelve (46. ábra) látható, hogy a CLZ kompaktabb szerkezettel rendelkezik a BIZ-hoz képest, emiatt alacsonyabb a konformációs szabadsága és nincs lehetősége mélyen belemerülni a CyD-ek apoláris üregébe.

A CLZ-CyD komplexek CD spektrumait (35. ábra) három csoportba tudjuk osztani az előjel alapján. A TMBCyD és a SBBCyD esetén dominánsan negatív ICD sávokat kaptunk. BCyD, valamint a DMBCyD esetén az ICD előjele a teljes hullámhossz tartományban pozitív, azonban sokkal kevésbé strukturált a jel alakja az előbbiekhöz képest. A CMBCyD, illetve a HPBCyD komplexek esetében detektált ICD jel pedig alternáló pozitív és negatív sávokat tartalmaz. A spektrális változásokat figyelembe véve, a Kodaka-Harata szabályok felhasználásával lehetőség van a komplex szerkezetének a becslésére. SBBCyD esetén, a negatívan töltött oldallánc és a ligand protonált nitrogénje közötti ionos kölcsönhatás gátolja a vendégmolekula bemerülését az üregbe. A rövidebb oldalláncokkal rendelkező CMBCyD és HPBCyD esetében a CLZ komplexképződésben

résztevő szubsztituensének mélyebb inklúziója képzelhető el, míg a pozitív ICD jelet adó komplexek esetében (BCyD és DMBCyD) nincs a peremen lévő oldalláncok miatti sztérikus gátlás és a molekula adott szubsztituense képes a mélyebb inklúzióra.

Az előbbieket alapján feltehető, hogy a SBBCyD-CLZ komplex esetén a CLZ döntően a CyD üregén kívül helyezkedik el, csak egy kis része kerül bele az üregbe. Az élesen elkülönülő átmenetek a csökkent konformációs szabadságra utalnak. Szintén ezt erősíti meg a BCyD üregének és a ligandum van der Waals térfogatának a mérete is: előbbi 307 \AA^3 , míg utóbbi 309 \AA^3 körül van. Mivel ez a két érték igen közel esik egymáshoz, emiatt is feltehető, hogy a teljes molekula nem fér bele a CyD üregébe. Ezt a tényt irodalmi adatok is megerősítik, melyek szerint a molekulának csak a fenil vagy klórfenil csoportja képes behatolni a CyD-ek üregébe[134]. Ezt mindegyik BCyD származék esetében figyelembe kell venni, emiatt a 10. táblázatban összefoglalásra került stabilitási állandó értékek alacsonyabbnak adódtak a BIZ-ra számolt értékeknél. A stabilitási állandókat a 36. ábrán látható görbék alapján számoltuk.

ACyD és GCyD esetén a mérések során csapadékleválás történt, emiatt nem lehetett a komplexek stabilitási állandóit számolni, bár mindkét esetben megjelent az ICD jel. A GCyD üregmérete nagyobb a BCyD-ekénél, emiatt feltételezhető, hogy a komplexképzés le tud zajlani, ACyD esetében azonban elsődlegesen egy külső kötődést lehet feltételezni a kisebb üregméret miatt.

5.2.4. Mikonazol (MIZ)

A mikonazol PSA értéke némiképpen magasabb mind a BIZ-énál, mind a CLZ-énál, míg $\log P$ értéke a BIZ-éhoz hasonló. Szerkezetét tekintve nagyobb konformációs szabadsággal rendelkezik mindkét korábban tárgyalt vegyületnél. Ezek alapján a stabilitási állandó értékeket a BIF és a CLZ-ra kapott értékek közé vártuk. A MIZ UV spektruma a BIZ-éhoz képest magasabb hullámhosszknál jelentkezik a diklórfenil szubsztituensnek köszönhetően. A 37. ábrán látható a MIZ, illetve néhány CyD komplexének UV spektruma. A komplexek spektruma hiper- és batokróm eltolódást mutat az eredeti vegyület spektrumához képest, azonban a BCyD és SBBCyD komplex spektruma gyakorlatilag teljes egyezőséget mutat, emiatt a két komplex között nem lehet különbséget tenni. Egyedül a GCyD esetén regisztrált spektrum mutatott eltérést, ahol jelentősebb batokróm eltolódást tapasztaltunk. Érdekesség még, hogy a korábban

bemutatott vegyületekkel szemben az UV spektrumokban megjelennek a benzoil sávok karakterisztikus csúcsai.

A CD spektrumok (37. ábra) igen jelentős eltérést mutatnak a különböző komplexek esetén, amely a vegyületek CyD-ek üregébe történő eltérő mértékű bemerüléséből eredhet. A CD spektrumokról leolvasott ellipticitás értékek koncentráció függése a 38. ábrán látható, az ebből számolt stabilitási állandók pedig az 11. táblázatban találhatóak. Feltehetően a sztérikus gátlásból eredően, nem a MIZ-SBBCyD komplex adódott a legstabilabbnak, mind a GCyD, mind pedig a DMBCyD esetén kapott értékek magasabbak ennél. A sztérikus gátlás a diklórfenil gyűrű nagyobb térkitöltésére, valamint a molekula magasabb konformációs szabadságára vezethető vissza.

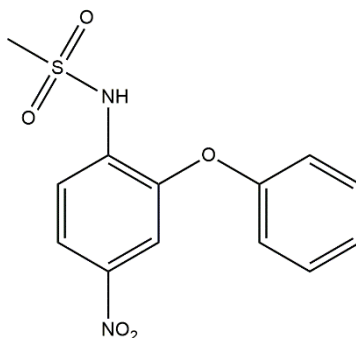
5.2.5. Tiokonazol (TIZ)

A tiokonazol szerkezetileg hasonló a mikonazolhoz, a különbség, hogy az egyik diklórfenil szubsztituenst itt klórtiofén helyettesíti, amely méretben kisebb. Ez a szerkezetbeli módosulás a PSA értéket nem változtatja meg, azonban a lipofilitást enyhén megnöveli. A spektrumokban (39. ábra) a legmagasabb hullámhossznál jelentkező, legintenzívebb átmenet a diklórfenil gyűrűtől származik, akárcsak a MIZ esetében. A szerkezeti hasonlóság ellenére, a MIZ- és a TIZ-CyD komplexek között lehet különbségeket találni. Elsőként érdemes kiemelni a GCyD komplexek CD spektrumának ellentétes előjelét, amely MIZ esetében pozitív, TIZ esetében viszont negatív. Ebből az következik, hogy a kromofór más orientációban helyezkedik el a komplexekben. CMBCyD esetében ICD jel egy maximum elérése után újból csökkenni kezd (40. ábra), amely arra utal, hogy az 1:1 arányú komplexen kívül más összetételű komplex keletkezik magasabb CyD koncentráció esetén. A stabilitási állandók számolásánál ebben az esetben az utolsó két adatpontot figyelmen kívül hagytuk, ennek ellenére a regressziós koefficiens értéke továbbra is alacsony a többi CyD komplexre számolt adatokhoz viszonyítva (12. táblázat). A többi CyD komplex spektruma is jól megkülönböztethető volt egymástól. ACyD és BCyD esetén is az ICD jel két, körülbelül azonos intenzitású maximummal rendelkezett. HPBCyD, SBBCyD, DMBCyD és CMBCyD komplexeknél batokróm eltolódást tapasztaltunk, valamint a magasabb hullámhossznál megjelenő maximum magasabb intenzitással rendelkezett. GCyD esetében pedig egy még erőteljesebb batokróm eltolódást és negatív előjelű ICD jelet regisztráltunk.

5.3. Fehérjekötődési vizsgálatok

5.3.1. Nimeszulid HSA-kötődésének vizsgálata

A nimeszulid a nemszteroid gyulladáscsökkentők csoportjába tartozó vegyület, melynek szerkezeti képlete a 47. ábrán látható. A molekula szulfonamid csoportjának köszönhetően savas karakterrel rendelkezik, így képes kötődni a HSA-hoz. A cél a kötődési állandó meghatározása volt a regisztrált ICD spektrumok alapján, a korábban (3.5. fejezet) ismertetett nemlineáris paraméterillesztés felhasználásával.



47. ábra: A nimeszulid szerkezeti képlete

A mérésekhez a HSA-ból desztillált víz felhasználásával 3,33 mg/ml koncentrációjú törzsoldat készült, amelyet a továbbiakban háromszorosára hígítottunk, így a végkoncentráció 1,11 mg/ml lett. Ezt az oldatot titráltuk a nimeszulidból metanollal készített 3 mg/ml koncentrációjú törzsoldattal. A regisztrált spektrumsorozatot a 41. ábra illusztrálja. A kötődés indukálta CD jel 290 nm feletti tartományban jelenik meg, a fehérjesávok megfigyelésére ezekkel a paraméterekkel nem volt lehetőség, mert a nimeszulid abszorpciós hozzájárulása miatt kedvezőtlen volt a jel/zaj arány.

A kötődési állandó meghatározása három párhuzamos mérésből valósult meg az ICD jel maximumának hullámhosszán, 377 nm-en. Az egyik mérés pontjaira illesztett görbét a 42. ábrán mutatjuk be. A mérésekből számított adatokat a 14. táblázat foglalja össze. Az értékek alapján a nimeszulid igen erősen képes kötődni a HSA-hoz.

6. Következtetések

A doktori munka során számos kismolekula kötődését vizsgáltuk biopolimer makromolekulákhoz CD spektroszkópiás módszerrel. A vizsgált hatóanyagok vagy hatóanyag-jelölt molekulák akirális vagy racém molekulák voltak, míg a biopolimerek mindegyike királis.

A CyD-ek esetében a komplexálódás során mérhető ICD jel nagyon szelektíven csak a komplexálódás eredményét képes detektálni. A regisztrált ICD spektrumok sokkal informatívabbak, mint pl. az UV spektrumok, és alig marad el az információtartalma az NMR spektroszkópiáétól, ugyanakkor érzékenységekben esetenként felül is múlja azt. A szelektivitás különösen a stabilitási állandók számításánál jelent nagy előnyt, mert más módszerek esetén általában a mért jel a szabad ligandum vagy vendégmolekula és a komplex móltörtekkel súlyozott átlagjelétől származik, míg az ICD jel csak a komplextől ered. A módszer alapjául szolgálhat egy olyan gyors és szelektív információt nyújtó eljárásnak, melynek segítségével számos CyD próbálható ki egy adott vendégmolekulával, és az ICD mérések alapján kiválasztható az adott célra leginkább megfelelő CyD. Méréseink során meghatároztunk 27 db állandót, amelyeket a 13. táblázatban foglalunk össze. Ezek között vannak olyanok, amelyek az irodalomban még nem találhatóak meg, illetve vannak olyan állandók, amelyek az irodalomban fellelhetők, de más módszer alapján számított értékek. Számos ezek közül jól korrelál a mi eredményeinkkel, azonban vannak jelentős eltérést mutató esetek is. Az eltéréseknek számos oka lehet. Ilyen okok lehetnek a CyD-ek különböző mértékű szubsztitúciójából adódó eltérések, vagy a jelentősen eltérő kísérleti körülmények. A CyD-ekkel végzett kísérletek eredményei alapján tervezzük a kölcsönhatások vizsgálatának kiterjesztését más poliszacharid jellegű segédanyagokra is.

A fentiekben leírt szelektivitásra utaló megállapítás érvényes a saját CD spektrummal rendelkező DNS és fehérje esetén is, amikor a makromolekulák abszorpciós sávjaival nem átfedő átmenettel rendelkező molekulák ICD jelét értékeljük. Ezenél a makromolekuláknál ugyanakkor a saját CD spektrumuk változása a ligandum kötődésének hatására szintén a komplex kialakulását jelzi. A kapott eredmények alapján elmondható, hogy a CD spektroszkópia érzékeny módszer az ilyesfajta kölcsönhatások vizsgálatára.

A kísérletek során sikerült igazolni, hogy a bakteriális eredetű plazmid DNS alkalmazható kötődési vizsgálatokra, azonban figyelembe kell venni, hogy az eltérő szuperhelikális szerkezete miatt a kapott spektrumokban eltéréseket lehet felfedezni a nyílt láncú DNS-ek spektrumával összevetve.

Összevetésre került a kurkuminnak és néhány kurkuminoidnak a DNS kötődése. Megállapítottuk, hogy míg a kurkumin mutat DNS-kötődést, a vizsgált, mintegy 30 szintetikus kurkuminoid esetében ez elvértve volt kimutatható. Az ICD jel és a szerkezetek alapján kurkumin kisárokba kötődő vegyület, míg a kurkuminoidok aspecifikusan kötődnek a DNS cukorfoszfát láncához. Kijelenthető továbbá, hogy a kurkuminoidok esetében tapasztalt sejtosztódást gátló hatás nem a DNS-kötődés eredményeként jön létre[135, 136].

CD és NMR mérések alapján megállapítottuk, hogy a szunitinib molekula képes a heterogén, természetes eredetű és a bakteriális plazmid DNS-hez is kötődni. A plazmid DNS-kötődés két lépésben zajlik le, első lépésként a szuperhelikális polinukleotid lánc kitekeredik, majd ezután interkaláció zajlik le.

Az arisztolochiasav I esetében feltártuk, hogy a molekula természetes eredetű nyílt láncú DNS-ekhez nem kötődik, ellenben bakteriális eredetű cirkuláris DNS-hez igen. A különbség a plazmid cirkuláris szerkezetének eredménye. Ez a jelenség alapja lehet olyan gyógyszerek fejlesztésének, melyek a baktériumok plazmidhoz köthető tulajdonságainak (pl.: rezisztencia) gátlásával fejtik ki hatásukat.

A fentiek alapján elmondható, hogy az ICD jel igen jól használható különféle DNS kölcsönhatások kimutatására *in vitro*, valamint lehetőséget nyújt a kötődési mód megállapítására. Az egyébként kináz-gátló hatású szunitinib DNS-kötődése szerepet játszhat az orális adagolás során tapasztalható mellékhatások kialakulásában is, mivel a bélhám sejtek osztódását befolyásolhatja.

Az ICD spektroszkópia szintén alkalmas gyógyszerek fehérjekötődésének vizsgálatára. A módszert az irodalomból már ismert nimeszulid-HSA kötődés igazolásával „validáltuk”. Amennyiben a vizsgált molekula rendelkezik olyan kromofórral, amely kívül esik a fehérjék abszorpciós tartományán ($\lambda > 280$ nm), úgy az ICD spektrum segítségével lehetőség van a kötődés igazolásán túlmenően a stabilitási állandó számítására is. Továbbá lehetőséget biztosít receptorok vagy más célfehérjék hatóanyag-kötésének gyors detektálására is.

7. Összefoglalás

A doktori munka során azt vizsgáltuk, mennyire alkalmazható az indukált cirkuláris dikroizmus jel különféle makromolekulák ligandum-kötődésének a jellemzésére. A vizsgált nagymolekulák különféle DNS-ek, ciklodextrinek, valamint a humán szérum albumin fehérje volt. DNS-kötődés esetében megállapítottuk a feltételezett kötődési módot, ciklodextrin komplexeknél, illetve a fehérjekötődés esetében pedig a képződő komplex stabilitási állandóit is sikerül kiszámolni a kötődés igazolása mellett.

A DNS-kötődési vizsgálatokat természetes eredetű heterogén DNS-eken kívül, a szunitinib molekula, illetve az arisztolochiasav I esetében egy bakteriális eredetű cirkuláris plazmid DNS-en is elvégeztük, amely *E. coli* baktériumból lett előállítva. Azt, hogy a plazmid DNS alkalmazható a kötődési vizsgálatokra, két modellvegyület felhasználásával igazoltuk. A szunitinibnél és az arisztolochiasavnál is láthatóvá vált, hogy a különféle DNS-ek esetében eltérő eredményeket kapunk, amely elsődlegesen a plazmid DNS cirkuláris és szuperhelikális szerkezetére vezethető vissza.

A kurkuminnak, illetve számos szintetikus úton előállított kurkuminoidnak is vizsgáltuk a DNS-kötődését. A kurkuminnál detektáltunk ICD jelet, azonban a szintetizált vegyületek közül csak 5 esetben tudtunk DNS-kötődést kimutatni.

Vizsgáltuk öt antifungális azol különféle ciklodextrinokkal képzett komplexeit. A komplexek CD spektrumának felvételén túl, nemlineáris paraméterillesztést felhasználva kiszámítottuk a komplexek egyensúlyi stabilitási állandóit: a kapott 27 állandóból 16-ot korábban még nem határoztak meg. Továbbá rámutattunk az adott módszer egyedülálló szelektivitására.

Végül pedig egy nemszteroid gyulladáscsökkentő molekulának, a nimeszulidnak határoztuk meg a humán szérum albuminhoz való kötődésének egyensúlyi állandóját.

8. Summary

In this Ph.D. work the application of the induced circular dichroism signal for ligand binding of different macromolecules has been investigated. The investigated large molecules included different types of DNA, natural and synthetic cyclodextrins as well as the human serum albumin. For ligand-DNA binding the mechanism of the interaction has been established, while for CyD and protein binding, in addition to proving the complexation, the stability constants could be calculated.

DNA binding studies for sunitinib and aristolochic acid I have been performed on natural heterogenic DNA types and the pUC18 plasmid DNA extracted from *E. coli* bacteria. Before these experiments, the usability of plasmid DNA for binding studies has been validated with two model compounds. For sunitinib and aristolochic acid, the obtained results showed differences for the natural DNAs than the plasmid, which is probably originated from the circular and supercoiled structure of the former.

The binding for the naturally occurring curcumin and a number of its synthetic derivatives has also been investigated. Curcumin showed a definitive DNA binding; however only 5 of the derivatives gave positive result for the same experiments.

The complexation of five different antifungal azoles, as model compounds, with various cyclodextrins has also been investigated. As well as recording the CD spectra for all complexes, using nonlinear parameter fitting, 27 stability constants have been calculated among which 16 have not been published in the literature previously. Furthermore, the unique selectivity of the method has been pointed out.

At last, the binding of a non-steroidal anti-inflammatory drug, nimesulide has been investigated to human serum albumin. Based on the acquired data, the binding stability constant could be calculated.

9. Irodalomjegyzék

1. Shibata T, Yamamoto J, Matsumoto N, Yonekubo S, Osanai S, Soai K. (1998) Amplification of a Slight Enantiomeric Imbalance in Molecules Based on Asymmetric Autocatalysis: The First Correlation between High Enantiomeric Enrichment in a Chiral Molecule and Circularly Polarized Light. *J Am Chem Soc*, 120: 12157–12158.
2. Blackmond DG. (2019) The origin of biological homochirality. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 11: 1–5.
3. Gal J. (2017) Pasteur and the art of chirality. *Nat Chem*, 9: 604–605.
4. McNaught AD, Wilkinson A. IUPAC. Compendium of Chemical Terminology. Blackwell Science Oxford, Oxford, 1997: 1135
5. Wermuth CG, Ganellin CR, Lindberg P, Mitscher LA. (1998) Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations 1998). *Pure Appl Chem*, 70: 1129–1143.
6. Jenkins AD, Stepto RFT, Kratochvíl P, Suter UW. (1996) Glossary of basic terms in polymer science (IUPAC Recommendations 1996). *Pure Appl Chem*, 68: 2287–2311.
7. van Vranken D, Weiss G. DNA. In: Scholl S (szerk.), *Introduction to Bioorganic Chemistry and Chemical Biology*. Garland Science, New York, 2013: 57–129.
8. Ghosh A, Bansal M. (2003) A glossary of DNA structures from A to Z. *Acta Crystallogr Sect D*, 59: 620–626.
9. https://en.wikipedia.org/wiki/File:A-DNA,_B-DNA_and_Z-DNA.png, 2020.01.08.
10. Watson JD, Crick FHC. (1953) Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*, 171: 737–738.
11. Dickerson RE. [5] DNA structure from A to Z. In: Burgess RR, Deutscher MP (szerk.), *DNA Structures Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA*. Academic Press Inc., San Diego, 1992: 67–111.
12. Mitsui Y, Langridge R, Shortle BE, Cantor CR, Grant RC, Kodama M, Wells RD. (1970) Physical and Enzymatic Studies on Poly d(I–C). Poly d(I–C), an Unusual Double-helical DNA. *Nature*, 228: 1166–1169.
13. Lafer EM, Valle RP, Möller A, Nordheim A, Schur PH, Rich A, Stollar BD. (1983)

- Z-DNA-specific antibodies in human systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest*, 71: 314–321.
14. Thomas CM, Summers D. (2008) Bacterial Plasmids. *Encycl Life Sci*, 1–9.
 15. Strekowski L, Wilson B. (2007) Noncovalent interactions with DNA: An overview. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen*, 623: 3–13.
 16. Haq I. (2002) Thermodynamics of drug-DNA interactions. *Arch Biochem Biophys*, 403: 1–15.
 17. Palchoudhuri R, Hergenrother PJ. (2007) DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. *Curr Opin Biotechnol*, 18: 497–503.
 18. Khan GS, Shah A, Zia-ur-Rehman, Barker D. (2012) Chemistry of DNA minor groove binding agents. *J Photochem Photobiol B Biol*, 115: 105–118.
 19. Sirajuddin M, Ali S, Badshah A. (2013) Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. *J Photochem Photobiol B Biol*, 124: 1–19.
 20. Gunda T. Daganatellenes szerek. In: Fülöp F, Noszál B, Szász G, Takácsné dr. Novák K (szerk.), *Gyógyszerészi Kémia*. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2010: 789–822.
 21. Cancer and Chemotherapy. In: Lemke TL, Williams DA (szerk.), *Foye’s Principles of Medicinal Chemistry*. Philadelphia, 2013: 1199–1266.
 22. López SL, Aiassa D, Benítez-Leite S, Lajmanovich R, Mañas F, Poletta G, Sánchez N, Simoniello MF, Carrasco AE. (2012) Pesticides used in South American GMO-based agriculture. A review of their effects on humans and animal models. *Adv Mol Toxicol*, 6: 41–75.
 23. Swift LH, Golsteyn RM. (2014) Genotoxic anti-cancer agents and their relationship to DNA damage, mitosis, and checkpoint adaptation in proliferating cancer cells. *Int J Mol Sci*, 15: 3403–3431.
 24. Ashby J. (1985) Fundamental structural alerts to potential carcinogenicity or noncarcinogenicity. *Environ Mutagen*, 7: 919–921.
 25. Cavalieri E, Saeed M, Zahid M, Cassada D, Snow D, Miljkovic M, Rogan E. (2012) Mechanism of DNA depurination by carcinogens in relation to cancer initiation. *IUBMB Life*, 64: 169–179.

26. Kow YW. (2002) Repair of deaminated bases in DNA. *Free Radic Biol Med*, 33: 886–893.
27. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. (2003) Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*, 17: 1195–1214.
28. Yoon JH, Bhatia G, Prakash S, Prakash L. (2010) Error-free replicative bypass of thymine glycol by the combined action of DNA polymerases κ and ζ in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 14116–14121.
29. Warren JJ, Forsberg LJ, Beese LS. (2006) The structural basis for the mutagenicity of O(6)-methyl-guanine lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 19701–19706.
30. Alexander P, Moroson H. (1962) Cross-linking of Deoxyribonucleic Acid to Protein following Ultra-Violet Irradiation of Different Cells. *Nature*, 194: 882–883.
31. Singh G. Preclinical Drug Development. In: Vohora D, Singh G (szerk.), *Pharmaceutical Medicine and Translational Clinical Research*. Academic Press, Cambridge, 2017: 47–63.
32. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use_en-23.pdf2008., 2020.01.04.
33. Wimmer T. Cyclodextrins. In: Elvers B, Hawkins S, Schulz G (szerk.), *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2003: 23–31.
34. Del Valle EMM. (2004) Cyclodextrins and their uses: A review. *Process Biochem*, 39: 1033–1046.
35. Szejtli J. (1998) Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem Rev*, 98: 1743–1753.
36. Szejtli J. (2004) Past, present, and future of cyclodextrin research. *Pure Appl Chem*, 76: 1825–1845.
37. Loftsson T, Duchêne D. (2007) Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int J Pharm*, 329: 1–11.
38. Stella VJ, Rao VM, Zannou EA, Zia V. (1999) Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes. *Adv Drug Deliv Rev*, 36: 3–16.

39. Li S, Purdy WC. (1992) Cyclodextrins and Their Applications in Analytical Chemistry. *Chem Rev*, 92: 1457–1470.
40. Zhang X, Zhang Y, Armstrong DW. (2012) 8.10 Chromatographic Separations and Analysis: Cyclodextrin Mediated HPLC, GC and CE Enantiomeric Separations. *Compr Chirality*, 8: 177–199.
41. Yu L, Wang S, Zeng S. (2013) Chiral mobile phase additives in HPLC enantioseparations. *Methods Mol Biol*, 970: 221–231.
42. Cagliero C, Sgorbini B, Cordero C, Liberto E, Rubiolo P, Bicchi C. Cyclodextrin Derivatives as Stationary Phases for the GC Separation of Enantiomers in the Flavor and Fragrance Field. In: Engel K-H, Takeoka G (szerk.), *Importance of Chirality to Flavor Compounds*. American Chemical Society, Washington, 2015: 15–34.
43. Loftsson T, Vogensen SB, Brewster ME, Konráosdóttir F. (2007) Effects of cyclodextrins on drug delivery through biological membranes. *J Pharm Sci*, 96: 2532–2546.
44. <https://www.fda.gov/media/70963/download2017.>, 2020.01.06.
45. Singh M, Sharma R, Banerjee UC. (2002) Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnol Adv*, 20: 341–359.
46. Szente L, Szemán J, Sohajda T. (2016) Analytical characterization of cyclodextrins: History, official methods and recommended new techniques. *J Pharm Biomed Anal*, 130: 347–365.
47. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/bridion-epar-product-information_en.pdf.](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/bridion-epar-product-information_en.pdf), 2020.01.16.
48. https://www.ema.europa.eu/en/documents/orphan-designation/eu/3/13/1124-public-summary-opinion-orphan-designation-2-hydroxypropyl-i2-cyclodextrin-treatment-niemann_en.pdf2015., 2020.01.17.
49. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/background-review-cyclodextrins-used-excipients-context-revision-guideline-excipients-label-package_en.pdf.](https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/background-review-cyclodextrins-used-excipients-context-revision-guideline-excipients-label-package_en.pdf), 2020. 01.17.
50. [https://cyclolab.hu/userfiles/cdn_2013_feb.pdf.](https://cyclolab.hu/userfiles/cdn_2013_feb.pdf), 2020.02.05.
51. Szegvári D, Zelkó R, Horváth P, Gergely A. (2006) Tracking of enantioselective solubility of rac-norgestrel in the presence of cyclodextrin by a CD spectroscopic

- method. *Chirality*, 18: 121–126.
52. Szegvári D, Zelkó R, Horváth P, Gergely A. (2007) Calculation of cyclodextrin-mediated enantiomer ratio shifting of racem norgestrel in aqueous solutions. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*, 57: 169–172.
 53. Wagner I, Musso H. (1983) New Naturally Occurring Amino Acids. *Angew Chemie Int Ed English*, 22: 816–828.
 54. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Protein Composition and Structure. In: Stryer L (szerk.), *Biochemistry*. W. H. Freeman and Company, New York, 2012: 25–60.
 55. https://regi.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0011_1A_Proteinbiotech_hu_book/ch15.html, 2020.07.07.
 56. Sznatzke G. Circular Dichroism: An Introduction. In: Berova N, Nakanishi K, Woody RW (szerk.), *Circular Dichroism Principles and Applications*. John Wiley and Sons Inc., New York, 2000: 1–35.
 57. Wagniere GH. On the Interaction of Light with Molecules: Pathways to the Theoretical Interpretation of Chiroptical Phenomena. In: Berova N, Polavarapu PL, Nakanishi K, Woody RW (szerk.), *Comprehensive Chiroptical Spectroscopy*. John Wiley and Sons Inc., New Jersey, 2012: 3–34.
 58. You L, Pescitelli G, Anslyn E V., Di Bari L. (2012) An Exciton-Coupled Circular Dichroism Protocol for the Determination of Identity, Chirality, and Enantiomeric Excess of Chiral Secondary Alcohols. *J Am Chem Soc*, 134: 7117–7125.
 59. Allenmark S. (2003) Induced circular dichroism by chiral molecular interaction. *Chirality*, 15: 409–422.
 60. Ardhammar M, Norden B, Kurucsev T. DNA-Drug Interactions. In: Berova N, Nakanishi K, Woody RW (szerk.), *Circular Dichroism Principles and Applications*. John Wiley and Sons Inc., New York, 2000: 741–768.
 61. Kypr J, Kejnovská I, Bednářová K, Vorlíčková M. Circular Dichroism Spectroscopy of Nucleic Acids. In: Berova N, Polavarapu PL, Nakanishi K, Woody RW (szerk.), *Comprehensive Chiroptical Spectroscopy*. John Wiley and Sons Inc., New Jersey, 2012: 575–586.
 62. Gray DM, Ratliff RL, Vaughan MR. Circular dichroism spectroscopy of DNA. In: Burgess RR, Deutscher MP (szerk.), *Methods in Enzymology*. Academic Press Inc., San Diego, 1992: 389–406.

63. Ferreira R, Artali R, Benoit A, Gargallo R, Eritja R, Ferguson DM, Sham YY, Mazzini S. (2013) Structure and Stability of Human Telomeric G-Quadruplex with Preclinical 9-Amino Acridines. *PLoS One*, 8: e57701.
64. Shin YA, Eichhorn GL. (1984) Formation of $\psi(+)$ and $\psi(-)$ DNA. *Biopolymers*, 23: 325–335.
65. Selvakumar B, Rajendiran V, Uma Maheswari P, Stoeckli-Evans H, Palaniandavar M. (2006) Structures, spectra, and DNA-binding properties of mixed ligand copper(II) complexes of iminodiacetic acid: The novel role of diimine co-ligands on DNA conformation and hydrolytic and oxidative double strand DNA cleavage. *J Inorg Biochem*, 100: 316–330.
66. Kypr J, Kejnovská I, Renčiuk D, Vorlíčková M. (2009) Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA. *Nucleic Acids Res*, 37: 1713–1725.
67. Pohl FM, Jovin TM. (1972) Salt-induced co-operative conformational change of a synthetic DNA: Equilibrium and kinetic studies with poly(dG-dC). *J Mol Biol*, 67: 375–396.
68. Bakshi K, Liyanage MR, Volkin DB, Middaugh CR. (2014) Circular dichroism of peptides. *Methods Mol Biol*, 1088: 247–253.
69. Woody RW, Tinoco I. (1967) Optical rotation of oriented helices. III. Calculation of the rotatory dispersion and circular dichroism of the alpha- and 310-helix. *J Chem Phys*, 46: 4927–4945.
70. Brahms S, Brahms J, Spach G, Brack A. (1977) Identification of β,β -turns and unordered conformations in polypeptide chains by vacuum ultraviolet circular dichroism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74: 3208–3212.
71. Woody RW. (2009) Circular dichroism spectrum of peptides in the poly(Pro)II conformation. *J Am Chem Soc*, 131: 8234–8245.
72. Lerman LS. (1961) Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. *J Mol Biol*, 3: 18–30.
73. Pritchard NJ, Blake A, Peacocke AR. (1966) Modified intercalation model for the interaction of amino acridines and DNA. *Nature*, 212: 1360–1361.
74. Qu X, Trent JO, Fokt I, Priebe W, Chaires JB. (2000) Allosteric, chiral-selective drug binding to DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 12032–12037.
75. Airoidi M, Barone G, Gennaro G, Giuliani AM, Giustini M. (2014) Interaction of

- Doxorubicin with Polynucleotides. A Spectroscopic Study. *Biochemistry*, 53: 2197–2207.
76. Ellestad GA. Drug and Natural Product Binding to Nucleic Acids Analyzed by Electronic Circular Dichroism. In: Berova N, Polavarapu PL, Nakanishi K, Woody RW (szerk.), *Comprehensive Chiroptical Spectroscopy Vol. II*. John Wiley and Sons Inc., New Jersey, 2012: 635–664.
77. Premvardhan L, Maurizot J-C. (2010) Netropsin binding in five duplex-dimer DNA constructs as a function of size and distance between binding sites: circular dichroism and absorption spectroscopy. *Eur Biophys J*, 39: 781–787.
78. Kodaka M. (1998) Application of a general rule to induced circular dichroism of naphthalene derivatives complexed with cyclodextrins. *J Phys Chem A*, 102: 8101–8103.
79. Harata K, Uedaira H. (1975) The Circular Dichroism Spectra of the β -Cyclodextrin Complex with Naphthalene Derivatives. *Bull Chem Soc Jpn*, 48: 375–378.
80. Perrin JH, Nelson DA. (1972) Induced optical activity following the binding of warfarin, indomethacin, 4-hydroxycoumarin and salicylic acid to human serum albumin. *Life Sci*, 11: 277–283.
81. Sjödin T, Roosdorp N, Sjöholm I. (1976) Studies on the binding of benzodiazepines to human serum albumin by circular dichroism measurements. *Biochem Pharmacol*, 25: 2131–2140.
82. Otagiri M, Yamamichi R, Marayama T, Imai T, Suenaga A, Imamura Y, Kimachi K. (1989) Drug Binding to α 1-Acid Glycoprotein Studied by Circular Dichroism. *Pharm Res An Off J Am Assoc Pharm Sci*, 6: 156–159.
83. Zsila F, Iwao Y. (2007) The drug binding site of human α 1-acid glycoprotein: Insight from induced circular dichroism and electronic absorption spectra. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*, 1770: 797–809.
84. Shahabadi N, Mohammadi S, Alizadeh R. (2011) DNA interaction studies of a new platinum(II) complex containing different aromatic dinitrogen ligands. *Bioinorg Chem Appl*, 2011: 429241.
85. Stephanos JJ. (1996) Drug-protein interactions: Two-site binding of heterocyclic ligands to a monomeric hemoglobin. *J Inorg Biochem*, 62: 155–169.
86. Kanakis CD, Tarantilis PA, Polissiou MG, Diamantoglou S, Tajmir-Riahi HA.

- (2005) Dna interaction with naturally occurring antioxidant flavonoids quercetin, kaempferol, and delphinidin. *J Biomol Struct Dyn*, 22: 719–724.
87. Kanakis CD, Tarantilis PA, Tajmir-Riahi HA, Polissiou MG. (2007) DNA interaction with saffron's secondary metabolites safranal, crocetin, and dimethylcrocetin. *DNA Cell Biol*, 26: 63–70.
 88. Hamai S. (1982) Association of Inclusion Compounds of β -Cyclodextrin in Aqueous Solution. *Bull Chem Soc Jpn*, 55: 2721–2729.
 89. Hu YJ, Liu Y, Pi ZB, Qu SS. (2005) Interaction of cromolyn sodium with human serum albumin: A fluorescence quenching study. *Bioorganic Med Chem*, 13: 6609–6614.
 90. Gonzalez-Ruiz V, Olives AI, Martin MA, Ribelles P, Ramos TM, Menendez JC. An Overview of Analytical Techniques Employed to Evidence Drug-DNA Interactions. Applications to the Design of Genosensors. In: Komorowska MA, Olsztyńska S (szerk.), *Biomedical Engineering, Trends, Research and Technologies*. InTech, London, 2011: 65–90.
 91. Zhang G, Shuang S, Dong C, Pan J. (2003) Study on the interaction of methylene blue with cyclodextrin derivatives by absorption and fluorescence spectroscopy. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc*, 59: 2935–2941.
 92. Becuwe M, Landy D, Delattre F, Cazier F, Fourmentin S. (2008) Fluorescent indolizine- β -cyclodextrin derivatives for the detection of Volatile Organic Compounds. *Sensors*, 8: 3689–3705.
 93. Granadero D, Bordello J, Pérez-Alvite MJ, Novo M, Al-Soufi W. (2010) Host-guest complexation studied by fluorescence correlation spectroscopy: Adamantane-cyclodextrin inclusion. *Int J Mol Sci*, 11: 173–188.
 94. Ghisaidoobe ABT, Chung SJ. (2014) Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: A focus on Förster resonance energy transfer techniques. *Int J Mol Sci*, 15: 22518–22538.
 95. Zhang G, Que Q, Pan J, Guo J. (2008) Study of the interaction between icariin and human serum albumin by fluorescence spectroscopy. *J Mol Struct*, 881: 132–138.
 96. Trynda-Lemiesz L. (2004) Paclitaxel-HSA interaction. Binding sites on HSA molecule. *Bioorganic Med Chem*, 12: 3269–3275.
 97. Di Micco S, Bassarello C, Bifulco G, Riccio R, Gomez-Paloma L. (2005)

- Differential-frequency saturation transfer difference NMR spectroscopy allows the detection of different ligand-DNA binding modes. *Angew Chemie - Int Ed*, 45: 224–228.
98. Tóth G, Jánoska Á, Szabó ZI, Völgyi G, Orgován G, Szente L, Noszál B. (2016) Physicochemical characterisation and cyclodextrin complexation of erlotinib. *Supramol Chem*, 28: 656–664.
 99. Orgován G, Kelemen H, Noszál B. (2016) Protonation and β -cyclodextrin complex formation equilibria of fluconazole. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*, 84: 189–196.
 100. Cala O, Guillière F, Krimm I. (2014) NMR-based analysis of protein-ligand interactions. *Anal Bioanal Chem*, 406: 943–956.
 101. Hamdan II, Skellern GG, Waigh RD. (1998) Separation of pd(GC)12 from pd(AT)12 by free solution capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*, 806: 165–168.
 102. Hamdan II, Skellern GG, Waigh RD. (1998) Use of capillary electrophoresis in the study of ligand-DNA interactions. *Nucleic Acids Res*, 26: 3053–3058.
 103. Araya F, Huchet G, McGroarty I, Skellern GG, Waigh RD. (2007) Capillary electrophoresis for studying drug-DNA interactions. *Methods*, 42: 141–149.
 104. Narayanaswamy M, Griffiths WJ, Howard PW, Thurston DE. (2008) An assay combining high-performance liquid chromatography and mass spectrometry to measure DNA interstrand cross-linking efficiency in oligonucleotides of varying sequences. *Anal Biochem*, 374: 173–181.
 105. Andrew Wang HJ, Gao YG, Liaw YC, Li YK. (1991) Formaldehyde Cross-Links Daunorubicin and DNA Efficiently: HPLC and X-ray Diffraction Studies. *Biochemistry*, 30: 3812–3815.
 106. Scriba GKE. (2008) Cyclodextrins in capillary electrophoresis enantioseparations - Recent developments and applications. *J Sep Sci*, 31: 1991–2011.
 107. Lindner W. (1987) Recent development in HPLC enantioseparation - a selected review. *Chromatographia*, 24: 97–107.
 108. Armstrong DW. (1984) Chiral stationary phases for high performance liquid chromatographic separation of enantiomers: A mini-review. *J Liq Chromatogr*, 7: 353–376.
 109. Urh M, Simpson D, Zhao K. Chapter 26 Affinity Chromatography. *General*

- Methods. In: Burgess RR, Deutscher MP (szerk.), *Methods in Enzymology*. Academic Press Inc., San Diego, 2009: 417–438.
110. Singh SS, Mehta J. (2006) Measurement of drug-protein binding by immobilized human serum albumin-HPLC and comparison with ultrafiltration. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*, 834: 108–116.
 111. Domenici E, Bertucci C, Salvadori P, Motellier S, Wainer IW. (1990) Immobilized serum albumin: Rapid HPLC probe of stereoselective protein-binding interactions. *Chirality*, 2: 263–268.
 112. Øtergaard J, Heegaard NHH. (2003) Capillary electrophoresis frontal analysis: Principles and applications for the study of drug-plasma protein binding. *Electrophoresis*, 24: 2903–2913.
 113. Busch MHA, Carels LB, Boelens HFM, Kraak JC, Poppe H. (1997) Comparison of five methods for the study of drug-protein binding in affinity capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*, 777: 311–328.
 114. Ahmad A, Ramakrishnan A, McLean MA, Breau AP. (2003) Use of surface plasmon resonance biosensor technology as a possible alternative to detect differences in binding of enantiomeric drug compounds to immobilized albumins. *Biosens Bioelectron*, 18: 399–404.
 115. Kobayashi H, Endo T, Ogawa N, Nagase H, Iwata M, Ueda H. (2011) Evaluation of the interaction between β -cyclodextrin and psychotropic drugs by surface plasmon resonance assay with a Biacore® system. *J Pharm Biomed Anal*, 54: 258–263.
 116. Lin LP, Huang LS, Lin CW, Lee CK, Chen JL, Hsu SM, Lin S. (2005) Determination of binding constant of DNA-binding drug to target DNA by surface plasmon resonance biosensor technology. *Curr Drug Targets Immune, Endocr Metab Disord*, 5: 61–72.
 117. Fox KR, Waring MJ. High-resolution footprinting studies of drug-DNA complexes using chemical and enzymatic probes. In: Burgess RR, Deutscher MP (szerk.), *Methods in Enzymology*. Academic Press Inc., San Diego, 2001: 412–430.
 118. Agrawal DK, Mishra PK. (2010) Curcumin and its analogues: Potential anticancer agents. *Med Res Rev*, 30: 818–860.
 119. Le Tourneau C, Raymond E, Faivre S. (2007) Sunitinib: A novel tyrosine kinase

- inhibitor. A brief review of its therapeutic potential in the treatment of renal carcinoma and gastrointestinal stromal tumors (GIST). *Ther Clin Risk Manag*, 3: 341–348.
120. Kuete V. Health Effects of Alkaloids from African Medicinal Plants. In: *Toxicological Survey of African Medicinal Plants*. Elsevier Inc. 2014: 611–633.
 121. Castro-Puyana M, Crego AL, Marina ML, García-Ruiz C. (2007) Enantioselective separation of azole compounds by EKC. Reversal of migration order of enantiomers with CD concentration. *Electrophoresis*, 28: 2667–2674.
 122. Van Doorne H, Bosch EH, Lerk CF. (1988) Formation and antimicrobial activity of complexes of β -cyclodextrin and some antimycotic imidazole derivatives. *Pharm Weekbl Sci Ed*, 10: 80–85.
 123. Penn SG, Bergström ET, Goodall DM, Loran JS. (1994) Capillary Electrophoresis with Chiral Selectors: Optimization of Separation and Determination of Thermodynamic Parameters for Binding of Tioconazole Enantiomers to Cyclodextrins. *Anal Chem*, 66: 2866–2873.
 124. Kelemen H, Csillag A, Hancu G, Székely-Szentmiklósi B, Fülöp I, Varga E, Grama L, Orgován G. (2017) Characterisation of Inclusion Complexes Between Bifonazole and Different Cyclodextrins in Solid and Solution State. *Maced J Chem Chem Eng*, 36: 81–91.
 125. Mohammed NN, Pandey P, Khan NS, Elokely KM, Liu H, Doerksen RJ, Repka MA. (2016) Clotrimazole–cyclodextrin based approach for the management and treatment of Candidiasis – A formulation and chemistry-based evaluation. *Pharm Dev Technol*, 21: 619–629.
 126. Tenjarla S, Puranajoti P, Kasina R, Mandal T. (1998) Preparation, characterization, and evaluation of miconazole- cyclodextrin complexes for improved oral and topical delivery. *J Pharm Sci*, 87: 425–429.
 127. Loftsson T, Brewster ME. (2012) Cyclodextrins as functional excipients: Methods to enhance complexation efficiency. *J Pharm Sci*, 101: 3019–3032.
 128. Pedersen M, Bjerregaard S, Jacobsen J, Mehlsen Sørensen A. (1998) A genuine clotrimazole γ -cyclodextrin inclusion complex-isolation, antimycotic activity, toxicity and an unusual dissolution rate. *Int J Pharm*, 176: 121–131.
 129. Nafisi S, Adelzadeh M, Norouzi Z, Sarbolouki MN. (2009) Curcumin binding to

- DNA and RNA. *DNA Cell Biol*, 28: 201–208.
130. Ertl P, Rohde B, Selzer P. (2000) Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. *J Med Chem*, 43: 3714–3717.
 131. Alimuddin M, Grant D, Bulloch D, Lee N, Peacock M, Dahl R. (2008) Determination of log D via automated microfluidic liquid-liquid extraction. *J Med Chem*, 51: 5140–5142.
 132. Avdeef A. *Absorption and Drug Development: Solubility, Permeability, and Charge State*. John Wiley and Sons, Hoboken, NJ, USA, May 7, 2012: 202-209.
 133. https://www.pharmacopoeia.com/Catalogue/Preview?uri=%2Fcontent%2Ffile%2Fproducts%2Fhealthandsafety%2FCat_253_GB.pdf, 2020.05.29.
 134. Pradines B, Gallard JF, Iorga BI, Gueutin C, Ponchel G, Loiseau PM, Bouchemal K. (2015) The unexpected increase of clotrimazole apparent solubility using randomly methylated β -cyclodextrin. *J Mol Recognit*, 28: 96–102.
 135. Huber I, Zupkó I, Gyovai A, Horváth P, Kiss E, Gulyás-Fekete G, Schmidt J, Perjési P. (2019) A novel cluster of C5-curcuminoids: design, synthesis, in vitro antiproliferative activity and DNA binding of bis(arylidene)-4-cyclanone derivatives based on 4-hydroxycyclohexanone scaffold. *Res Chem Intermed*, 45: 4711-4735.
 136. Huber I, Rozmer Z, Gyöngyi Z, Budán FC, Horváth P, Kiss E, Perjési P. (2020) Structure activity relationship analysis of antiproliferative cyclic C5-curcuminoids without DNA binding: Design, synthesis, lipophilicity and biological activity. *J Mol Struct*, 1206: 127661.

10. Saját publikációk jegyzéke**10.1. A disszertáció alapját képező publikációk**

Kiss E, Mirzahosseini A, Hubert Á, Ambrus A, Órfi L, Horváth P. (2018) DNA binding of sunitinib: Spectroscopic evidence via circular dichroism and nuclear magnetic resonance. *J Pharm Biomed Anal*, 150: 355–361.

IF: 2,983

Kiss E, Szabó VA, Horváth P. (2019) Simple circular dichroism method for selection of the optimal cyclodextrin for drug complexation. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*, 95: 223–233.

IF: 1,560

Huber I, Zupkó I, Gyovai A, Horváth P, **Kiss E**, Gulyás-Fekete G, Schmidt J, Perjési P. (2019) A novel cluster of C5-curcuminoids: design, synthesis, in vitro antiproliferative activity and DNA binding of bis(arylidene)-4-cyclanone derivatives based on 4-hydroxycyclohexanone scaffold. *Res Chem Intermed*, 45: 4711–4735.

IF: 2,262

Huber I, Rozmer Z, Gyöngyi Z, Budán FC, Horváth P, **Kiss E**, Perjési P. (2020) Structure activity relationship analysis of antiproliferative cyclic C5-curcuminoids without DNA binding: Design, synthesis, lipophilicity and biological activity. *J Mol Struct*, 1206: 127661.

IF: 2,463**10.2. A disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk**

Papp LA, Foroughbakhshfasaei M, Fiser B, Horváth P, **Kiss E**, Sekkoum K, Gyéresi Á, Hancu G, Noszál B, Szabó ZI, Tóth G. (2019) Reversed-phase HPLC enantioseparation of pantoprazole using a teicoplanin aglycone stationary phase—Determination of the enantiomer elution order using HPLC-CD analyses. *Chirality*, 32: 158-167.

IF: 2,171

Bartha GS, Tóth G, Horváth P, **Kiss E**, Papp N, Kerényi M. (2019) Analysis of aristolochlic acids and evaluation of antibacterial activity of *Aristolochia clematitis* L. *Biol Fut*, 70: 323–329.

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Horváth Péter egyetemi docensnek a doktori munkám irányításáért.

Köszönöm Dr. Mirzahosseini Arash egyetemi tanársegédnek a DNS-kötődés vizsgálatához szükséges NMR mérések elvégzését és kiértékelését.

Köszönöm Dr. Ambrus Attila egyetemi docensnek, az Orvosi Biokémiai Intézet munkatársának, valamint Dr. Huber Ágnesnek, hogy előállították számunkra a plazmid DNS-t.

Köszönöm Dr. Huber Imre egyetemi docensnek és munkatársainak a Pécsi Tudományegyetem Gyógyszerészi Kémiai Intézetéből, hogy felkértek a kurkuminoidok vizsgálatára.

Köszönöm Dr. Órfi László egyetemi tanárnak, hogy rendelkezésemre bocsátotta a szunitinib molekulát a kísérletekhez.

Továbbá köszönetemet szeretném nyilvánítani a Gyógyszerészi Kémiai Intézet valamennyi munkatársának a vidám és baráti légkör megteremtéséért.

Végül pedig szeretném megköszönni Családomnak, hogy mindenben támogattak.