

A pályázat célja új szilika-alapú és monolit típusú állófázisok fejlesztése affinitás kromatográfiás alkalmazásokra, illetve ezek segítségével új a betegségek diagnosztizálását, és a kóros folyamatok pontos molekuláris mechanizmusainak megértését segítő biomarkerek azonosítása. Emellett a rendelkezésre álló eszközökkel a terápiás célok megvalósításának segítése bioaktív vegyületek hatásainak meghatározásával, befolyásolásával és hatékonyságának növelésével.

A pályázat keretein belül készített, különböző pórusméretű és eltérő hidrofóbicitású: C18, C30-as és C60-as- szilika-állófázisok szilárd fázisú extrakciós felhasználása dúsításra és izolálásra széles körben folyik. Többek között szomatosztatin dúsítására biológiai mintákból (folyóiratban még nem közölt eredmények [1]), valamint gyakran alkalmazott fogamzásgátlókból származó szennyezések, azonosítására természetes vizekből, illetve azok élőlényekben való felhalmozódásának, hatásainak kimutatására [2, 3], és enzimatikusan glikálódott fehérjék (fibrinogén, humán szérum albumin, RNáz A) emésztése során kapott glikált, triptikus peptidek tömegspektrometriás vizsgálata előtti frakcionálására, dúsítására, és ezáltal a rövidtávú glikáció („short-term glycation”) vizsgálatára [4,5].

Emellett az általunk kidolgozott kovalensen kötött fullerénnel módosított különböző pórusméretű szilika vékonyrétegben történő alkalmazása lehetővé tette kismolekulák lézerdesorpciós ionizációval (LDI) történő vizsgálatát is, repülési idő (TOF) típusú detektorral rendelkező tömegspektrométer használatával [6]. Ilyen módon új eljárást dolgoztunk ki az 1500 Da-nál kisebb tömegű molekulák pikomolos nagyságrendben történő azonosítására. A módszer széleskörű felhasználhatóságát szénhidrátok, aminosavak, peptidek, foszfolipidek és gyógyszermolekulák vizsgálatával bizonyítottuk.

Kidolgoztunk egy „zöld-eljárást” C18-as szilikaállófázis környezetkímélő előállítására (az eljárás validálása még nem zárult le, az eredményeket még nem publikáltuk). A savazott szilikát C18-as prepolimerrel (metil-hidro- és metil-oktil-sziloxán kopolimer) kezelve, a folyamatot (nitrogén atmoszférában) mikrohullám segítségével meggyorsítva és a mosást egy lépéses alkoholos mosásra redukálva nemcsak leegyszerűsítettük és felgyorsítottuk az állófázis elkészítését, hanem a környezetszennyező szerves oldószer felhasználást is nagyban csökkentettük.

A városi lakosság nagy része szenved a cukorbetegség különböző típusaitól, és azok komplikációitól. Ez részben az egészségtelen életmódnak, részben a nem megfelelő étkezési szokásoknak köszönhető. Az emelkedett vércukorszint egyik következménye a fehérjék nem enzimátikus glikációja. Nem-enzimátikus glikáció során a fehérjék primer aminos csoportjaihoz egyszerű cukor egységek kötődnek, melyek első lépésben egy labilis Schiff-bázist adnak, mely tovább alakul egy stabilabb keto-aminná, amit Amadori-terméknek nevezünk. A fehérjék glikáltsága nagyban befolyásolja kölcsönhatásaikat, illetve a felismerési folyamatokat. A vércukorszinttel ellentétben (melyet pl. egy inzulin injekció vagy stressz

helyzet nagyban befolyásol) egy hosszabbtávú „képet” ad a vérben található cukor mennyiségéről, lehetővé téve ezzel például a beteg gyógyszeradagjának pontosabb beállítását, illetve valós állapotának jobb felmérését.

Boronát affinitás kromatográfia segítségével humán szérum albumin nem enzimatikusan glikálásából származó Amadori-termékeket dúsítottunk, valamint egészséges és 2-es típusú diabétesz mellituszban szenvedő betegektől származó minták segítségével azonosítottunk egy lehetséges biomarkert (az 1738,9 m/z glikált peptid) [5].

A tervek között szerepelt aminofenilboronátot tartalmazó monolit szintézise glikált fehérjék szelektív dúsítására, melyeket sok esetben használtak már számos betegség (köztük a cukorbetegség) biomarkereként. Eddig még le nem írt, adott betegségre jellemző glikált molekulák azonosítása új diagnosztikus és terápiás technikák kifejlesztését teszi lehetővé. A 2,2'-azobiszizobutironitril alkalmas keresztkötőnek bizonyult. A polimerizációs folyamatot, a monolit pórusméretét, és az eluálási eljárást standard segítségével optimalizáltuk. A 12 napig *in-vitro* glikált humán szérum albumin megfelelőnek bizonyult a 2 típusú diabétesz betegek vérében történő folyamatok modellezésére. E glikált fehérje triptikus emésztéséből származó peptidkeverék, mint standard alkalmazásával végeztük kísérleteinket. Az emésztményeket az affinitás kromatográfias dúsítást követően tömegspektrométerrel analizáltuk. Az eljárás optimalizálása után 2-es típusú diabétesz mellituszos beteg és kontroll mintákat is vizsgáltunk. (A mintákat a Pécsi Tudományegyetem 2. Belgyógyászati Klinikája és Nefrológiai Központja biztosította). A betegek szűrése és az általunk vizsgálni kívánt négy csoporthoz a megfelelő számú minta begyűjtése nagyon lassú és körülményes folyamatnak bizonyult, első sorban a sok figyelembeveendő paraméter miatt (egyéb betegségek megléte kizárta az alanyokat a vizsgálatból, hiszen egy más folyamatból származó fehérje-módosulás meghamisította volna az eredményeket). Sajnos az egészségügyi átszervezések mellett szembesülnünk kellett azzal, hogy már csak a „nagyon beteg”, halmozottan kóros állapotban lévő emberek jutnak el az ambulanciára. Emiatt a vizsgált csoportokat többször módosítani kellett, ami miatt újra kellett kezdeni a vizsgálatokat. Talán ez járult hozzá, hogy várakozásainkkal ellentétben, csak egy biomarker azonosítása volt lehetséges. A boronát fázis felhasználása lehetővé tette egy potenciális diabétesz biomarker azonosítását: az 1738,9 m/z glikált peptid megtalálható volt minden általunk vizsgált 2-es típusú diabéteszes betegnél, de nem volt jelen az egészséges személyeknél. Vizsgálatainkból kiderült, hogy ez a peptid a HSA [414-428] peptidrégiójában található és a módosítás a K414 és az R428-at érinti [7].

Emellett az együttműködés keretében vizsgáltuk Crohn betegségben (az emésztőrendszer krónikus gyulladása) szenvedő cukorbeteg albuminúriáját [8]. Méretkizárásos folyadékromatográfiát alkalmazva a betegség aktív fázisában jelentősen nagyobb mennyiségű glikált fehérje volt mérhető, mint a remissziós fázisban. Sikeresen azonosítottunk két olyan biomarkert (α 1-savas glikoprotein, illetve Zn- α 2- glikoprotein), melyek jellemezhetik a beteg állapotát.

A 2-es típusú cukorbetegség esetén a szövetek vérellátása gyakran csökken, ami a napjainkban tapasztalható a világon a legtöbb embert érintő betegségek egyik fő oka. Így a cukorbetegség ezen fajtáját kiváltó folyamatok molekuláris patomechanizmusának megértése

nagyon fontos a diabétesz és az ehhez kapcsolódó vazomotoros diszfunkciók (makro- és mikroangiopátia) lehetséges kezelésének kidolgozása szempontjából. Kísérleteink [9] azt mutatják, hogy az érfalban felhalmozódó orto-tirozin szerepet játszik a tökéletlen, inzulin-kiváltotta relaxációban módosítva a nitrogénmonoxid vazodilatárikus hatását, az eNOS-on keresztül. Az oxidatív folyamatokban jelentősen megnő az oxidált orto-tirozin mennyisége, ami konformációs változást indukál a fehérjékben ezzel kóros folyamatokat (az inzulinra adott tökéletlen vazomotoros válasz) indítva el. Ezt alátámasztja, hogy a 2-es típusú diabétesz mellitusban és emellett kónikus vese elégtelenségben (CKD: chronic kidney disease) szenvedő betegekben megnő az orto-tirozin mennyisége, ami a keringési komplikációkhoz vezethet. Az „áttörési jelenség” vizsgálatában végzett közös munka járult hozzá, hogy Wittmann István professzor Úr beadhatott egy szabadalmat az Európai Szabadalmi Bizottsághoz, mely az oxidatív stressz okozta betegségek megelőzéséről és lehetséges kezeléséről szól. Az eredmények alátámasztják, hogy a para-tirozin alkalmas a szervezetben az oxidatív stressz hatására, illetve a 2-es típusú diabétesz mellitus mellett megjelenő krónikus veseelégtelenségben nagyobb mennyiségben képződő orto- (illetve meta-) tirozin okozta inzulin-, illetve eritropoetin (EPO)- tolerancia visszafordítására, emellett feltételezhetően visszaszoríthatja a túlsúly által kiváltott „metabolikus szindróma” okozta tüneteket is.

Szintén az oxidatív stressz elleni védelem fontos eszközei lehetnek a polifenolok, többek között a rezveratrol. A rezveratrolt tartalmazó állófázis kifejlesztésére irányuló kísérleteink nem vezettek kedvező eredményre. Nem sikerült elérni, hogy a rezveratrol három fenolos hidroxilja közül mindig ugyan az kötődjön a monolithoz, illetve a nem monolit-kapcsolt, hanem egyéb állófázishoz rögzített rezveratrollal végzett kísérletek során sem tudtunk reprodukálhatóan mások által még le nem írt rezveratrolkötő fehérjéket azonosítani.

Bár ezek a kísérletek nem voltak sikeresnek mondhatók, miután a pályázat célja nem csak állófázisok fejlesztése, hanem biomarkerek, (oxidatív stressz okozta gyulladási válaszok és egyéb káros folyamatok elleni) bioaktív vegyületek azonosítása is, más növényi hatóanyagokkal kapcsolatos kísérleteket is folytattunk. Fahéj- és szegfűszegolaj antimikrobiális hatását vizsgáltuk *Pseudomonas aeruginosa* külső membránfehérjéire kifejtett hatásán keresztül [10]. Bár a növényi olajok antimikrobiális hatásának mechanizmusa még nem teljesen tisztázott, sikerült igazolnunk, hogy az olajok carvacrol és p-cymene tartalma hősokk fehérjék szintézisét indukálja. A kezelések egyértelműen befolyásolják a külső membránfehérje összetételt, egyes fehérjék expressziója megnő, míg másoké csökken. Kísérleteink alapján valószínűsíthető, hogy a flagellin bioszintézis és a flagella „felépítése” hatékony antimikrobiális célpontok lehetnek a növényi olajok hatóanyagai számára. A folyamatok pontos tisztázásához, elméletünk igazolásához további kísérletekre van szükség.

Melliolatus officinalis-ból izolált violaxantin, lutein és lutein^{5,-6}-epoxid *in vitro* gyulladás csökkentő hatását is tanulmányoztuk [11]. Már korábban is végeztünk kísérleteket karotinoidokkal [12]. Illetve tervezzük karotinoid-glikozidok, -C-vitamin illetve -ciklodextrin származékok szintézisét és tisztítását, melyek az erősen apoláris karotinoidok vízoldhatósági problémáit áthidalva, azok erős antioxidáns hatását megőrizve jó gyógyszer jelöltek lehetnek.

Előzetes eredményeink [13] alapján, melyek során palládium katalizált amino-karbonilálás, illetve keresztkötés (Suzuki-, Sonogashira-, Stille-) során sikerült hatékonyan előállítani négyszeresen funkcionizált, ezáltal „mély-üregű” kavítand származékokat, tervezzük még sztereoszelektív, keresztkötött, szubsztituált kavítandokkal borított állófázisok bioszenzorként, illetve királis állófázisként történő alkalmazását. Valamint esetleges célzott gyógyszer szállítóként való kipróbálását.

A polimerizációban szerzett ismereteinket a fogászok által használt tömőanyagok minőségének meghatározásában, a legjobb polimerizációs eljárás kiválasztásában, illetve a szájdaganatokat okozó, tömésből kioldódó rákkeltő anyagok mennyiségi meghatározásában is alkalmazni tudtuk [14].

A nyálmirigyekben keletkező, gyakran fájdalmakat okozó nyálkövek kialakulásának mechanizmusa máig nem ismert. Az úgynevezett „szerves mag” teória szerint, a nyálkő képződést úgy indítja el egy epiteliális- vagy bakteriális „csomópont”, mint kristályképződést az oltókristály [15]. Erre a „szerves magra” épül fel a kő. Célunk volt a Pécsi Fogászati Klinikán eltávolított nyálkövek belső, mag részéből fehérje elemzést végezni a mechanizmus tisztázására [16]. Bár az általunk végzett proteomikai elemzés deffenzint mutatott ki a nyálkő perifériális részén, sem az analitikai vizsgálatok, sem a scanning elektronmikroszkópos felvételek nem igazolták a belső mag részen a szerves szerkezet meglétét, így a kialakulás folyamatának tisztázásához, és az ok-okozati összefüggések feltérképezéséhez még további kísérletek elvégzésére van szükség.

A pályázat keretein belül kapott eredményeinket számos nemzetközi-és itthoni konferencián publikáltuk előadások és poszterek formájában, valamint a pályázat időtartama alatt 11 cikket publikáltunk nemzetközi folyóiratban, valamint kettőt itthoni tudományos folyóiratban, egy cikket beküldtünk és még vannak nem közölt eredményeink. A cikkekre az EISZ alapján összesen 69 hivatkozás érkezett.

Hivatkozások:

1. Gábor Maász, Éva Jámbor, Ágnes Bóna, Anikó Takátsy, László Márk Quantitative LC-MS based analysis of somatostatin in human clinical samples 29th Informal Meeting on Mass Spectrometry, 15-19. May.2011, Italy
2. Avar P, Maasz G, Takacs P, Lovas S, Zrinyi Z, Svigruha R, **Takatsy A**, G-Toth L, Pirger Z. HPLC-MS/MS analysis of steroid hormones in environmental water samples Accepted in *Drug Testing and Analysis*
3. Pirger Zsolt, Maasz Gábor, Takács Péter, Lovas Sándor, Zrínyi Zita, Svigruha Réka, **Takátsy Anikó**, G-Tóth László, Avar Péter Ágoston Humán eredetű szteroid szennyezések kimutatása a Balaton és a Zala vízgyűjtőjén HPLC MS/MS analitikai módszerrel, *Hidrológiai Közlöny*, 2015
4. Böddi, K.*, **Takátsy, A***, Szabó, Sz., Markó, L., Márk, L., Wittmann, I., Ohmacht, R., Montskó, G., Vallant, R. M., Ringer, T., Bakry, R., Huck, C. W., Bonn, G. K., Szabó, Z. Use of fullerene-, octadecyl-, and triacontyl silica for solid phase extraction of tryptic peptides obtained from unmodified and in vitro glycosylated human serum albumin and fibrinogen. *Journal of Separation Science* **32** (2009) 295-308.

5. **Takátsy, A.**, Böddi, K., Nagy L., Nagy, G., Szabó, Sz., Markó, L., Wittmann, I., Ohmacht, R., Ringer, T., Bonn, G. K., Gjerde, D., Szabó, Z. :Enrichment of Amadori products derived from the nonenzymatic glycation of proteins using microscale boronate affinity chromatography. *Analytical Biochemistry* **393** (2009) 8-22., IF: 3.287
6. Szabó, Z. Vallant, R. M, **Takátsy, A.**, Bakry, R., Najam-ul-Haq, Rainer, M., Huck, C., Bonn, G. K., Laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of small molecules using fullerene-derivatized silica as energy-absorbing material *Journal of Mass Spectrometry* **45** (2010) 545-552 IF:3.411
7. **Anikó Takátsy**: Boronate functionalized polymer monoliths for identification of new biomarkers in type II diabetes mellitus; **HPLC 2011**, 19-23. June, 2011, Budapest, Hungary
8. Markó, L., Sziget, N., Szabó, Z., Böddi, K., **Takátsy, A.**, Ludány, A., Kőszegi, T., Molnár, A., Wittmann, I., Potential urinary biomarkers of disease activity in Crohn's disease, *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, **45** (2010) 440-1448. IF:2.084
9. Szijarto IA, Molnar GA, Mikolas E, Fisi V, Cseh J, Laczy B, Kovacs T, Boddi K, **Takatsy A**, Gollasch M, Koller A, Wittmann I: Elevated Vascular Level of ortho-Tyrosine Contributes to the Impairment of Insulin-Induced Arterial Relaxation, *HORMONE AND METABOLIC RESEARCH* 46:(11) pp. 749-752. (2014), 2014
10. Felso P, Horváth G, Bencsik T, Godányi R, Lemberkovics E, Böszörményi A, Böddi K, **Takátsy A**, Molnár P, Kocsis B; Detection of the antibacterial effect of essential oils on outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa* by lab-on-a-chip and MALDI-TOF/MS, *Flavour and Fragrance Journal* **28**:(6) (2013) 367-372. IF:1.824
11. Györgyi Horváth, Violetta Eichertné-Andres, **Anikó Takátsy**, Gergely Gulyás, Erika Turcsi, József Deli, Éva Szőke, Zsuzsanna Helyes, Péter Molnár. Carotenoid Composition in Flowers of *Melilotus officinalis* L. and Investigation of In Vitro Anti-Inflammatory Effect of RAMEB-Lutein-5,6-epoxide (submitted to *Planta Medica*)
12. Háda, M., Nagy, V., **Takátsy, A.**, Deli, J., Hait, J., Agócs, A. Introduction of click chemistry to carotenoids *Tetrahedron Letters* **53** (2012) 2480–2482. IF:2.618
13. Csók, Zs., **Takátsy, A.**, Kollár, L. Highly selective palladium-catalyzed aminocarbonylation and cross-coupling reactions on a cavitand scaffold, *Tetrahedron* **68** (2012) 2657-2661. IF: 3.011
14. Lempel Edina, Böddi Katalin, Szalma József, Szabó Zoltán, **Takátsy Anikó** The Degree of Conversion of Composites in Different Layer Thickness Using Different Light-Curing Sources 45th Meeting of the Continental European Division of the International Association of Dental Research (CED-IADR) with the Scandinavian Division (NOF) August 31-September 3, 2011
15. József Szalma, Katalin Böddi, Edina Lempel, Zoltán Szabó, Lajos Olasz, Anikó Takátsy: Protein identification from Submandibular Salivary Stones with MALDI-TOF Mass Spectrometry, *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 2010
16. Szalma J, Böddi K, Lempel E, Sieroslawska AF, Szabó Z, Harfouche R, Olasz L, **Takátsy, A.**, Guttman A; Proteomic and Scanning Electron Microscopic Analysis of Submandibular Sialoliths, *Clinical Oral Investigations* **17**:(7) (2013) 1709-1717. IF: 2.200

*A szerzők egyenlő arányban vettek részt a munkában, így megosztott első szerzős közleményről van szó.