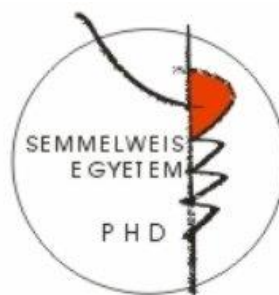


Anyatej oligoszacharidok analitikai jellemzése

Doktori értekezés

Dr. Balogh Réka

Semmelweis Egyetem
Gyógyszerésztudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Béni Szabolcs egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Zsigrainé dr. Vasanits Anikó egyetemi adjunktus
Dr. Kalász Huba szaktanácsadó

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Török Tamás professzor emeritus
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Perjési Pál egyetemi tanár
Dr. Ludányi Krisztina egyetemi docens

Budapest
2018

Tartalomjegyzék

| | | |
|--------|---|----|
| 1. | Rövidítések jegyzéke..... | 4 |
| 2. | Bevezetés..... | 8 |
| 3. | Irodalmi háttér..... | 9 |
| 3.1. | Az anyatej és a kolosztrum fogalma, összetétele és a szoptatás..... | 9 |
| 3.1.1. | Az anyatej oligoszacharidok kutatásának rövid története..... | 9 |
| 3.1.2. | Az anyatej és a kolosztrum..... | 10 |
| 3.1.3. | A szoptatás..... | 12 |
| 3.2. | Az anyatej összetételének összehasonlítása más emlősök tejével..... | 14 |
| 3.3. | Az oligoszacharidok szerkezeti jellemzése..... | 15 |
| 3.4. | Az oligoszacharidok bioszintézise..... | 17 |
| 3.5. | Az oligoszacharidok metabolizmusa..... | 20 |
| 3.6. | Az oligoszacharidok biológiai szerepe..... | 21 |
| 3.6.1. | Prebiotikus hatás..... | 21 |
| 3.6.2. | Antiadhezív funkció..... | 22 |
| 3.6.3. | Immunmoduláns hatás..... | 24 |
| 3.6.4. | Nekrotizáló enterokolitisz elleni védelem..... | 24 |
| 3.6.5. | Agyi fejlődésben betöltött szerep..... | 25 |
| 3.6.6. | Az anyai szervezetre gyakorolt hatások..... | 26 |
| 3.7. | Mesterséges táplálás: az oligoszacharidok pótlása, a tápszerek összetétele..... | 26 |
| 3.8. | Az oligoszacharidok analitikai vizsgáló módszereinek áttekintése..... | 28 |
| 3.8.1. | Elválasztástechnika..... | 30 |
| 3.8.2. | Kapcsolt módszerek..... | 31 |
| 4. | Célkitűzések..... | 34 |
| 4.1. | A diszacharid építőelemek vizsgálata..... | 34 |
| 4.2. | Triszacharidok vizsgálata gázkromatográfiával..... | 35 |
| 5. | Módszerek..... | 37 |
| 5.1. | Lakto- <i>N</i> -bióz és <i>N</i> -acetillaktózamin vizsgálata..... | 37 |

| | | |
|--------|--|----|
| 5.1.1. | Anyatej minták, standard anyagok és reagensek..... | 37 |
| 5.1.2. | Műszerek | 37 |
| 5.1.3. | HILIC módszer..... | 37 |
| 5.1.4. | RP-HPLC módszer | 37 |
| 5.1.5. | PGC | 38 |
| 5.1.6. | Mintaelőkészítés..... | 39 |
| 5.1.7. | Módszervalidálás..... | 41 |
| 5.2. | Gázkromatográfiás oligoszacharid analízis | 42 |
| 5.2.1. | Standardok és reagensek | 42 |
| 5.2.2. | Mintaelőkészítés..... | 42 |
| 5.2.3. | GC-MS paraméterek bemutatása | 43 |
| 5.2.4. | Módszervalidálás..... | 43 |
| 6. | Eredmények..... | 45 |
| 6.1. | Lakto- <i>N</i> -bióz és <i>N</i> -acetillaktózamin vizsgálata | 45 |
| 6.1.1. | PGC alapú elválasztás | 45 |
| 6.1.2. | Módszervalidálás..... | 46 |
| 6.1.3. | Anyatej minták vizsgálata | 48 |
| 6.2. | Gázkromatográfiás oligoszacharid analízis | 49 |
| 6.2.1. | Standard anyagok vizsgálata | 49 |
| 6.2.2. | Módszervalidálás..... | 50 |
| 6.2.3. | Anyatej minták vizsgálata | 51 |
| 7. | Megbeszélés | 53 |
| 7.1. | Lakto- <i>N</i> -bióz és <i>N</i> -acetillaktózamin vizsgálata | 53 |
| 7.1.1. | HILIC | 53 |
| 7.1.2. | RP HPLC..... | 55 |
| 7.1.3. | PGC alapú elválasztás és problémák..... | 57 |
| 7.1.4. | Validáláskor figyelembe veendő tényezők | 62 |
| 7.2. | 2'-FL és 3-FL vizsgálata..... | 62 |

| | | |
|--------|--|----|
| 7.2.1. | Fragmentációs mintázat értelmezése..... | 62 |
| 7.2.2. | Kromatográfiás megfontolások..... | 64 |
| 8. | Következtetések..... | 66 |
| 8.1. | Lakto- <i>N</i> -bióz és <i>N</i> -acetillaktózamin jelenléte az anyatejben..... | 66 |
| 8.2. | 2'-FL és 3-FL mennyiségi jellemzése, biológiai relevancia..... | 67 |
| 9. | Összefoglalás..... | 68 |
| 10. | Summary..... | 69 |
| 11. | Irodalomjegyzék..... | 70 |
| 12. | Saját publikációk jegyzéke..... | 79 |
| 12.1. | Az értekezés alapját képező közlemények..... | 79 |
| 12.2. | Más témákhoz kapcsolódó saját közlemények..... | 79 |
| 13. | Köszönetnyilvánítás..... | 80 |

1. Rövidítések jegyzéke

2'-FL – 2'-*O*-fukozillaktóz

3-FL – 3-*O*-fukozillaktóz

β4GalT1 – β1-4-galaktoziltranszferáz

DC-SIGN – dendritikus sejtek felszínén található lektin; a HIV célpontja

DSLNT – diszialillakto-*N*-tetraóz

EIC – extrahált ion kromatogram

ELSD – elpárologtatás utáni fényszórásmérésen alapuló detektor

FAB-MS – gyors atom bombázásos tömegspektrometria

FOS – frukto-oligoszacharid

Fuc – L-fukóz

FUT 2, 3, x – fukoziltranszferáz enzim 2, 3, x

Gal – D-galaktóz

GALT – galaktóz-1-foszfát-uridil-transzferáz/galaktoziltranszferáz enzim

GC - gázkromatográfia

Glc – D-glükóz

GlcNAc – *N*-acetilglükózamin

GlcNAcT (β3GlcNAcT, β6GlcNAcT) – *N*-acetilglükózaminiltranszferáz enzim

GOS – galakto-oligoszacharid

HILIC – hidrofil interakción alapuló folyadékkromatográfia

HIV 1, 2 – Human Immunodeficiency Virus 1, 2; szerzett immunhiányos tünetegyüttes

HMDS – hexametildiszilazán

HMO – anyatej oligoszacharid

HPAEC – nagyhatékonyságú anioncserélő kromatográfia

HPLC – nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia

HPTLC – nagyhatékonyságú vékonyréteg kromatográfia

iGnT – β 3GlcNAcT enzim

IGnT – β 6GlcNAcT enzim

IL-10 – interleukin 10

LacNAc – *N*-acetillaktózamin

LNB – lakto-*N*-bióz

LNFP – lakto-*N*-fukopentaóz

LNnT – lakto-*N*-neotetraóz

LOD – detektálási/kimutathatósági határ

LOQ – kvantifikálási/mennyiségi jellemzési határ

LST – monoszialillakto-*N*-tetraóz

MALDI-FTICR-MS - mátrix-segített lézer deszorpció/ionizációs Fourier transzformációs ion ciklotron rezonancia tömegspektrometria

MALDI-TOF-MS - mátrix-segített lézer deszorpció/ionizációs repülési idő analizátoros tömegspektrometria

MEKC – micelláris elektrokinetikus kromatográfia

MRM – többcsatornás reakciókövetés

MS – tömegspektrometria

NaBH₄ – nátrium-bórhidrid

NaBO₂ – nátrium-metaborát

NEC – nekrotizáló enterokolitisz

Neu5Ac – *N*-acetilneuraminsav

Neu5Gc – *N*-glikolilneuraminsav

NMR – mágneses magrezonancia spektroszkópia

PAD – pulzáló amperometriás detektor

PGC – porózus grafit állófázis

PMP – 1-fenil-3-metil-5-pirazolon

QIT-MS - kvadrupól-ioncsapda tömegspektrometria

QTOF-MS - kvadrupól-repülési idő analizátoros tömegspektrometria

RP-HPLC – fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia

RSD – relatív standard deviáció

RSV – respiratorikus szinciciális vírus

Sia – sziálsav

ST (ST3Gal4, ST6Gal1, ST6GalNac5) – szialiltranszferáz enzim és altípusai

TFA – trifluorecetsav

TIC – totál ion kromatogram vagy teljes ionáram kromatogram

TMS – trimetilszilil

TMSO – trimetilszilil-oxim

TMSOH – trimetilszilanol

TNF α – tumor nekrozis faktor α

UDP-galaktóz – uridin-difoszfát-galaktóz

WHO – World Health Organization; Egészségügyi Világszervezet

2. Bevezetés

Az anyatejes táplálás fontossága napjainkban egyaránt jelen van a hétköznapi párbeszédekben és a tudományos fórumokon. Mindez nem véletlen, hiszen egyre több kutatás világít rá az anyatej komplex és „utánozhatatlan” összetételére, amely számtalan jótékony hatásával a csecsemők legideálisabb táplálékának tekinthető [1].

Az anyatej a legnagyobb mennyiségben előforduló lipidek, fehérjék és a laktóz mellett ezekkel összevethető, sőt a fehérjéket meghaladó mennyiségben tartalmaz oligoszacharidokat. Amíg az előbbiek főként tápláló funkciót töltenek be, addig a fehérjékkel nem konjugált, rendkívül változatos szerkezetű oligoszacharidok a csecsemők számára emészthetetlenek [2-5]. Jogosan merül fel a kérdés, hogy ez esetben milyen célból találhatók meg az anyatejben, hiszen ilyen nagy mennyiségű, haszontalan összetevő előállítása az anyai szervezetnek egyértelmű energiavesztés lenne [2]. Az elmúlt évtizedekben egyre több kutatócsoport tűzte ki célul az egyes oligoszacharidok funkciójának megismerését. Ennek köszönhetően tudjuk, hogy hozzájárulnak a csecsemő egészséges bélflórájának kialakításához, védelmet nyújtanak számos kórokozó (*Campylobacter jejuni*, *Vibrio cholerae*, *Streptococcus pneumoniae* stb.) ellen, immunmoduláns hatással rendelkeznek, csökkentik a koraszülöttek esetében nagy halálozási aránnyal járó nekrotizáló enterokolitisz (NEC) kialakulásának valószínűségét, hozzájárulnak a csecsemő agyi fejlődéséhez, sőt még az anyai szervezetben is képesek kórokozók elleni védő funkciót betölteni [1].

Annak ellenére, hogy egyre több oligoszacharid szerkezetét sikerült azonosítani és közülük néhányhoz már konkrét biológiai funkciót is társítottak. Az anyatejben eddig kimutatott több, mint 200 egyedi oligoszacharid közül még számos szerkezet esetében nem történt meg az izolálást követő pontos szerkezetazonosítás és még több biológiai funkció feltárása várat magára. Napjainkra a tápszergyártók már oligoszacharidokkal dúsított termékekkel próbálják az anyatej egyre jobb és összetettebb alternatíváit nyújtani [6]. Mindez azonban még gyerekcipőben jár, hiszen a több tucat azonosítatlan szerkezet, ezek mennyiségi jellemzőinek ismerete, a biológiai funkciók azonosítása elengedhetetlen egy igazán összetett termék előállításához. Az anyatej komplex, napról napra és egyénről egyénre változó összetételét mesterségesen valószínűleg sosem lehet majd utánózni. Azonban – többek között a jelen disszertáció anyagával is – olyan, a gyakorlatban is hasznosítható információkhoz jutunk, amivel akár adott betegség megelőzésére alkalmas tápszerek előállítása is megvalósulhat.

3. Irodalmi háttér

3.1. Az anyatej és a kolosztrum fogalma, összetétele és a szoptatás

3.1.1. Az anyatej oligoszacharidok kutatásának rövid története

Az anyatejben változó mennyiségben előforduló és nagy szerkezeti diverzitást mutató oligoszacharidok kutatása egészen az 1800-as évek végére nyúlik vissza. Ebben az időben a csecsemőhalandóság rendkívül magas volt, a 30%-ot is elérte. Ezzel összefüggésben néhány gyermekorvos megfigyelte, hogy az anyatejjel táplált csecsemők arányaiban kisebb valószínűséggel kapnak el fertőző betegségeket és így jobbak a túlélési esélyeik, mint a tehéntejjel táplált társaiknak. Elsőként egy osztrák gyermekorvos és mikrobiológus, Theodor Escherich (1886) talált összefüggést az intesztinális baktériumflóra és a csecsemő emésztése között, eredményeit követve pedig Moro (1900) és Tissier (1900) felfedezték, hogy az anyatejjel, illetve a más tejjel táplált csecsemők székletének baktériumflórája eltérő [1, 7-9].

Miután Eschbach 1888-ban az anyatejet vizsgálva arra a következtetésre jutott, hogy az emberi tej egy „másfajta laktózt” tartalmaz, kémiai szempontból is középpontba kerültek – az ekkor még ismeretlen szerkezetű és tulajdonságú – oligoszacharidok. Hamarosan világossá vált, hogy a két tej között a laktóz szempontjából nincs különbség, azonban az anyatej tartalmaz egy, a laktóztól eltérő szénhidrát frakciót is [10]. Az 1930-as évek elején Polonowski és Lespagnol jellemezték az általuk talált *N*-tartalmú szénhidrát frakciót és elnevezték „gynolactose”-nak, majd pár évvel később Polonowski Montreuil-lel elvégezte az oligoszacharidok elválasztását is papírkromatográfiával [11, 12]. Az oligoszacharidok kutatásában az igazi áttörés az 1900-as évek közepén következett be, amikor Richard Kuhn és Paul György rávilágítottak, hogy a *Lactobacillus bifidus* alfajainak növekedését serkentő „bifidusz faktor” és a „gynolactose” frakció egy és ugyanaz [13]. Ők már az oligoszacharid frakció mennyiségi viszonyait is próbálták feltárni, amely során kiderült, hogy azok mennyisége a szülés után folyamatosan csökken [14]. A rákövetkező években Montreuil és Richard Kuhn kutatócsoportjaikkal több, mint egy tucat oligoszacharidot fedeztek fel és jellemezték [1]. Ezen oligoszacharidok némelyikéről kiderült, hogy Lewis-vércsoport determináns szerkezeti elemeket is tartalmaznak.

Napjainkban az anyatej oligoszacharidok kutatása a tápszergyártók oldaláról is nagy hangsúlyt kap, az egyre szerteágazóbb analitikai technikáknak köszönhetően pedig már több, mint 200 egyedi oligoszacharid szerkezet került azonosításra [15].

3.1.2. Az anyatej és a kolosztrum

Az újszülött számára a létező legösszetettebb és legtökéletesebb táplálékforrás az emlőmirigy által termelt kolosztrum, illetve az ezt követően termelődő anyatej. Napjainkra számos tanulmány igazolta, hogy az anyatejjel táplált gyermekek rövid és hosszútávon egyaránt egészségesebbek, mint a tápszereken felnőtt társaik, és az is egyre inkább elfogadott, hogy a szoptatásnak az utód érzelmi fejlődésében is fontos szerepe van [16]. Ezzel összhangban az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization) álláspontja szerint az újszülöttet hat hónapos koráig kizárólag anyatejjel kell táplálni, majd a hatodik hónap után lehet elkezdni a hozzátáplálást, de a szoptatás folytatása így is javasolt a gyermek második életévéig [17].

A kolosztrum a szülés előtti és utáni napban kis mennyiségben termelődő sűrű, sárgás, hashajtó hatású folyadék, amely immunológiai hatású komponensekben (IgA, laktoferrin, leukociták) és növekedési faktorokban (pl. epidermális növekedési faktor) gazdag. Az anyatejhez képest jóval kisebb mennyiségben tartalmaz laktózt, káliumot és kalciumot, viszont jelentősen nagyobb a nátrium-, klorid- és magnézium-tartalma. A kolosztrumot nagyjából 3 nappal szülés után az úgynevezett átmeneti tej váltja fel, amely a kolosztrum és az érett tej közötti átmenetet jelenti: még mindig jelentős benne az immunológiai hatású anyagok mennyisége, de emellett már jelentős tápláló kapacitással is szolgál. Végül a szülést követő nagyjából 4-6. hétre alakul ki az érett tej [18, 19].

Az anyatej összetétele biztosítja a csecsemő számára szükséges összes makro- és mikrotápanyagot, így a fehérjéket (9-12 g/l), az elsődleges szénhidrátforrásként szolgáló laktózt (67-78 g/l), a lipideket (32-36 g/l), különböző ásványi anyagokat és nyomelemeket, valamint az összes víz- és zsírolékony vitamint – bár a K-vitamin és sokszor a D-vitamin szintje is éltrendtől függetlenül nagyon alacsony az anyatejben, és pótlásuk szükséges a csecsemő számára (**1. táblázat**) [19-23]. Az anyatej makrotápanyagainak köszönhetően átlagosan 60-75 kcal/100 ml energiatartalmat biztosít, amely jó közelítéssel a 2%-os zsírtartalmú tehéntej energiatartalmával egyezik meg. Számos kismolekula jelenlétét is igazolták az anyatejben, úgymint a kreatin, kreatinin, urea, nukleotidok és aminosavak, melyek közül a glutaminsav és a taurin fordul elő a legnagyobb mennyiségben [20, 24]. Ezen összetevők mellett az anyatejben különböző bioaktív faktorok is azonosíthatók, ilyenek a növekedési hormonok, az immunológiai funkciót betöltő citokinek, kemokinek, makrofágok, illetve az őssejtek. Az őssejtek pontos szerepe egyelőre nem tisztázott, a többi bioaktív faktor azonban egyértelműen a csecsemő egészséges fejlődésében és a betegségekkel szembeni túlélésben tölt be kulcsszerepet [19].

1. táblázat – Az anyatejben megtalálható összetevők, valamint azok főbb képviselői [19-23].

| Összetevő | Képviselői |
|-----------------------------|---|
| lipidek | foszfatidil-etanolamin/-szerin/-kolin/-inozitol, palmitinsav, olajsav |
| fehérjék | β -kazein, α -laktalbumin, laktoferrin, IgA, szérum albumin, kazein, lizozim, enzimek, növekedési faktorok, hormonok |
| szénhidrátok | laktóz (leggyakoribb, ~70 g/l), oligoszacharidok, glikopeptidek |
| ásványi anyagok, nyomelemek | Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , cink, jód, kobalt, réz, vas stb. |
| vitaminok | K-vitamin kivételével az összes vitamin |
| nitrogéntartalmú vegyületek | kreatin, kreatinin, nukleinsavak, nukleotidok, húgysav, karbamid, glükózamin |
| sejtes elemek | epitél sejtek, neutrofil granulociták, makrofágok, limfociták, leukociták |

A fehérjék, a laktóz és a lipidek nagy koncentrációja egyértelmű, hiszen ezek az anyatej tápláló funkcióját betöltő összetevők. Azonban az anyatejben a fehérjéket meghaladó mennyiségben (5-20 g/l) fordulnak elő nagy szerkezeti variabilitást mutató, emészthetetlen, fehérjékkel nem konjugált oligoszacharidok, amelyek így az anyatej harmadik leggyakoribb összetevői a laktóz és a zsírok után. Az oligoszacharidok mennyisége a kolosztrumban akár a 20-25 g/l koncentrációt is elérheti [2-5]. Figyelembe véve, hogy a várandósság, a szülés és a szülést követően a csecsemő ellátása és anyatejjel való táplálása rendkívüli igénybevételnek tesz ki az anyai szervezetet, az oligoszacharidok jelentős biológiai szerepet kell, hogy betöltsenek. Hiszen egy ilyen energiaigényes időszak során nagy mennyiségű, „szükségtelen” anyag bioszintézise további terhet ró az anyai szervezetre, ami nyilvánvaló szelekciós hátrányt eredményezne [2].

Az anyatej egy dinamikusan változó biológiai folyadék, amelynek bár a hozzávetőleges összetétele megadható, de egy minden időpillanatra érvényes összetétellel mégsem jellemezhető, mivel egyéni és időbeli variabilitást mutat (utóbbit napszaktól függően és a laktáció teljes időtartamára nézve egyaránt). Az egyéni variabilitás okai közé tartozik a szoptatás gyakorisága, az édesanya életmódja, testsúlya, táplálkozási szokása (különösképpen a fehérjebevitel mértéke), etnikuma, Lewis-vércsoportja, szekretor státusza és egyéb tényezők [2, 19]. A szekretor státuszt a Szekretor gén domináns vagy recesszív jellege, vagyis az általa kódolt FUT2 fukoziltranszferáz enzim jelenléte vagy hiánya határozza meg. Az anyatej összetételét emellett nagymértékben meghatározza a csecsemő igénye, egészségi állapota is. Megfigyelték, hogy a koraszülött csecsemőknek életet adó édesanyák teje nagyobb

koncentrációban tartalmazott oligoszacharidokat, valamint fehérjékben és zsírokban is jóval gazdagabb volt [4, 24, 25].

Az egyéni variabilitás mellett az anyatej időbeli változását is megfigyelhetjük. Ahogyan a fejezet elején ismertetésre került, az első egy – másfél hónapban a kolosztrumtól az érett tej kialakulásáig jelentős összetételbeli változást figyelhetünk meg. Bár jóval kisebb mértékben, de a laktáció további szakaszában is megfigyelhetők változások [19]. A hosszútávú változások mellett az egy napon, sőt szoptatáson belüli változások is jelentősek. A délutáni és esti órákban termelődött tej általában zsírosabb, mint az éjszakai és reggeli órákban termelődő, ezzel elősegítve az éjszakai nyugodtabb alvást. A szoptatás során pedig először mindig egy hígabb, szomjoltó anyatej távozik a mellből, majd ezt követi a táplálóbb hátsó tej, amely kétszer vagy akár háromszor annyi zsírt tartalmaz, mint az első tej [26, 27].

3.1.3. A szoptatás

A WHO szoptatásra vonatkozó iránymutatása nem csupán a gyermek fizikális egészségi állapota és fizikális fejlődése miatt követendő. A gyermek érzelmi fejlődésében, az anyagyermek kapcsolat kialakulásában is fontos szerepet tölt be a szoptatással kialakuló testi kontaktus [28].

Emellett nem szabad megfeledkeznünk a szoptatás pozitív hatásairól az anyai szervezet szempontjából. A szoptatás során a mellbimbó mechanikai ingerlésével oxitocin szabadul fel, ami méhkontrakciót vált ki, ezzel szülés után csökkentve a vérzést és elősegítve a mihamarabbi méhregenerációt [29]. Az oxitocin felszabadulása egyaránt csökkenti a hipotalamusz prolaktin inhibitor faktor elválasztását, aminek hatására nő a vér prolaktinkoncentrációja, ami laktációs amenorreát (vérzéskimaradást) eredményez [18, 30]. A laktációs amenorea ideje alatti viszonylag állandó hormonszint csökkenti a mell- és petefészekrák egyes típusainak kialakulását, emellett csökkenti a posztmenopauzális oszteoporózis kialakulásának kockázatát is [16].

A szoptatás és az anyatej egyértelmű előnyei ellenére számos csecsemő tápszerrel való táplálásra szorul. Ennek hátterében kismértékben egészségügyi kontraindikációk állnak, nagyobb mértékben azonban az édesanya élethelyzete és/vagy egyéni döntése. A magyarországi tendencia 2001-es adatok alapján: kizárólagos anyatejes táplálást 4 hónapos korig a csecsemők 62%-a, 6 hónapos korig pedig 35%-a kapott [31, 32]. Bár a cél ennek az arálynak a növelése lenne, Magyarországhoz képest az Egyesült Királyságban – és több más országban is – még alacsonyabb a kizárólagos anyatejes táplálásban részesülő csecsemők aránya: 1995-ös adatok alapján 28% és 21% volt a 4, illetve 6 hónapig kizárólag anyatejjel táplált gyermekek aránya [33].

A szoptatás kontraindikációi közé tartoznak egyes anyai fertőző megbetegedések, az édesanya gyógyszeres kezelése, illetve a csecsemő egészségi állapota. A legtöbb anyai fertőzőes megbetegedés esetén a szoptatás megszakítása nem indokolt, hiszen figyelembe véve a fertőzések lappangási idejét, mire a betegség tünetei az édesanyán jelentkeznek, a csecsemő addigra már jó eséllyel átesett a fertőzésen. Emellett – ahogyan az a 3.6 fejezetben tárgyalásra kerül –, az anyatejben megtalálható különféle oligoszacharidok védelmet nyújthatnak a fertőzések ellen. Azonban a súlyos következményekkel járó fertőzőes megbetegedések esetén, mint a HIV-1, HIV-2, 1-es és 2-es típusú humán T-sejtes leukémia-limfóma vírus, valamint a hemorrágiás lázzal járó betegségek (ebola, marburg betegség) és súlyos, invazív fertőzéssel járó megbetegedések (brucellózis, *Staphylococcus aureus*-, *Haemophilus influenzae*-, *S. pneumoniae*-, *Neisseria meningitidis*-fertőzés) esetén a szoptatás nem folytatható, vagy a kezelés sikerességéig szüneteltetendő. Az édesanya szervezetét súlyosan legyengítő megbetegedések esetén (súlyos veseelégtelenség, szisztémás lupusz eritematozus központi idegrendszeri vaszkulitisszel, encefalitisz, stb.) is szükségessé válhat a szoptatás szüneteltetése vagy elhagyása [34].

Az édesanya gyógyszeres kezelése szintén indokolhatja a szoptatás szüneteltetését. A gyógyszermolekulák fizikai-kémiai paraméterei jelentősen befolyásolják azok kiválasztódását az anyatejbe: az 500 Da-nál kisebb méretű, alacsony plazmakötésű és $pK_a > 7,2$ karakterű molekuláknál számíthatunk a legnagyobb anyatejben mért koncentrációra [35]. Ennek ellenére a tudomány jelenlegi állása szerint csak a gyógyszerek viszonylag szűk csoportja jelent klinikailag szignifikáns veszélyt az anyatejjel táplált csecsemőkre, amelyek az alábbiak: kemoterapeutikumok, kábítószeres, antiepileptikumok, ergot alkaloidok és radiofarmakonok. Az amidaron, a ciklosporin és a lítium esetén pedig a tejben mérhető koncentrációk szigorú monitorozása szükséges [36].

A csecsemő egészségi állapota is indokolhatja a szoptatás megszakítását vagy limitálását. A felnőttek körében jól ismert, puffadással, hasmenéssel járó laktózintolerancia a csecsemők körében rendkívül ritka és nem indokolja feltétlenül a laktózmentes tápszerekre való átállást [34]. Ezzel ellentétben a galaktóz-1-foszfát-uridil-transzferáz (GALT) enzim genetikai defektusa miatt kialakuló galaktozémia (sárgaságot, levertséget, epilepsziaszerű görcsöket, hepatomegáliát okoz) esetén mindenképpen szükséges az anyatej laktózmentes, szójaalapú tápszerekkel való helyettesítése [37, 38]. Fenilketonuria esetén szintén speciális étrendre van szükség, azonban a csecsemő számára szükséges fenilalanin-bevitel érdekében az anyatejes táplálást csökkentett mértékben ugyan, de folytatni kell, amit fenilalanin-mentes tápszerekkel kell kiegészíteni. Cisztás fibrózis esetén szükséges lehet hidrolizált fehérjetartalmú

tápszerekkel pótolni az anyatejet. Hiperbilirubinémia esetén, amikor a bilirubin nagy koncentrációt ér el a vérben, a szoptatás néhány napos szüneteltetése szükséges, mialatt hidrolizált fehérjetartalmú tápszerekkel kell csökkenteni a bilirubin intesztinális felszívódását [34].

3.2. Az anyatej összetételének összehasonlítása más emlősök tejével

Az emberi tej, összehasonlítva más emlősök által termelt tejjel, egyedülállóan nagy mennyiségben tartalmaz oligoszacharidokat [39]. Az oligoszacharid-mintázat komplexitása is mindössze az elefánttejjel összehasonlítható mértékű, amely az anyatej oligoszacharid-mintázatának komplexitását is meghaladja. Érdekes, hogy ennek megfelelően a két faj ontogenezisében több hasonlóságot is találhatunk: mindkét faj lassan növekszik, relatíve nagy és jól fejlett központi idegrendszerrel rendelkeznek, amelynek fejlődése mindkét faj esetében főként a születés után történik meg, emellett mindkét faj magas intelligenciával rendelkezik és sok tanult viselkedést mutat [5]. Az enkefalizáció mértéke is mindkettő esetben jóval meghaladja az emberszabásúak hasonló értékeit. Ennek ellenére a főemlősökre a sokkal komplexebb oligoszacharidok jelenléte, és azok nagyobb diverzitása jellemző, ellentétben a nem-főemlősökkel. Az emberi tejben található oligoszacharidok 50-80%-a fukozilált, amely a főemlősök közül a legnagyobb arány: a csimpánzok tejében a fukozilált oligoszacharidok aránya 50%, a gorillák esetében pedig 15%. Ezzel szemben a szializáció kisebb mértékű: egységesen 10-30% között változik [40].

A kereskedelmi szempontból és így a tápszergyártás szempontjából is releváns háziállatok többségének – szarvasmarha, kecske, bány, sertés – a teje több, mint 2-3 nagyságrenddel kisebb mennyiségben tartalmaz oligoszacharidokat, és ezek diverzitása is jelentősen kisebb, mint az emberi tejé, valamint szerkezeti eltérések is megfigyelhetők. A neutrális oligoszacharidok közül a fukozilált oligoszacharidok előfordulása rendkívül ritka a háziállatok tejében. A savas karakterű oligoszacharidok esetében pedig a szialsav *N*-acetilneuraminsav (Neu5Ac) és *N*-glikolilneuraminsav (Neu5Gc) formája is azonosítható, ellentétben az anyatejjel, amiben a szialsav csak *N*-acetilneuraminsav (Neu5Ac) formában található meg. Emellett a fukozilált és szializált oligoszacharidok egymáshoz viszonyított aránya is eltérő az anyatejhez képest: a háziállatok esetében a szializált oligoszacharidok a fukozilált oligoszacharidokhoz képest nagyobb arányban fordulnak elő [41, 42].

2. táblázat – A csecsemőtápszerek alapjául szolgáló tehéntej és az anyatej összehasonlítása: bár a tehéntej fehérjetartalma magasabb, az oligoszacharid-tartalma jelentősen alacsonyabb, mint az anyatejé.

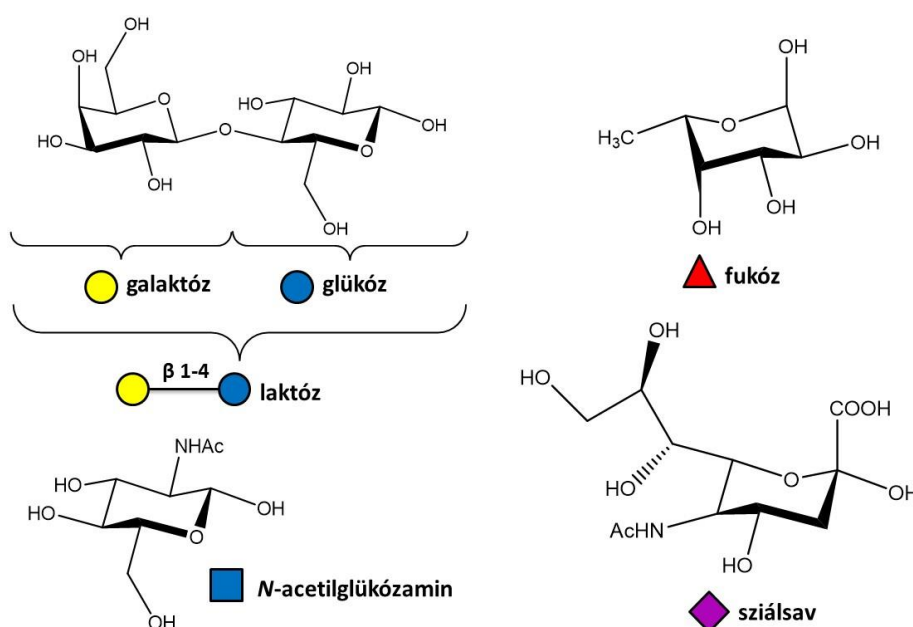
| anyatej | összetevő | tehéntej |
|---------|---------------|----------|
| 8 | fehérje (g/l) | 32 |

| | | |
|-------|----------------------------------|------|
| 41 | zsír (g/l) | 37 |
| 70 | laktóz (g/l) | 48 |
| 5-15 | oligoszacharidok (g/l) | 0,05 |
| > 200 | detektált oligoszacharidok száma | ~ 40 |
| 50-80 | fukozilált oligoszacharidok (%) | 1 |
| 10-20 | szializált oligoszacharidok (%) | 70 |

Tekintettel arra, hogy a jelenleg forgalomban lévő tápszerek jelentős hányadának alapját a tehéntej adja, fontos kitérni az anyatej és a tehéntej összehasonlítására (**2. táblázat**). A tehéntej fehérjetartalma nagyjából négyszerese az anyatej fehérjetartalmának, a zsírtartalma közel azonos, azonban a laktóz és főként az oligoszacharidok mennyisége elmarad az anyatejhez képest. Ráadásul a jóval kisebb mennyiségű oligoszacharid frakció kevésbé diverz [41], így nyilvánvalóan nem tudja biztosítani a csecsemőnek azt a számos jótékony hatást, amelyet az anyatej magában hordoz.

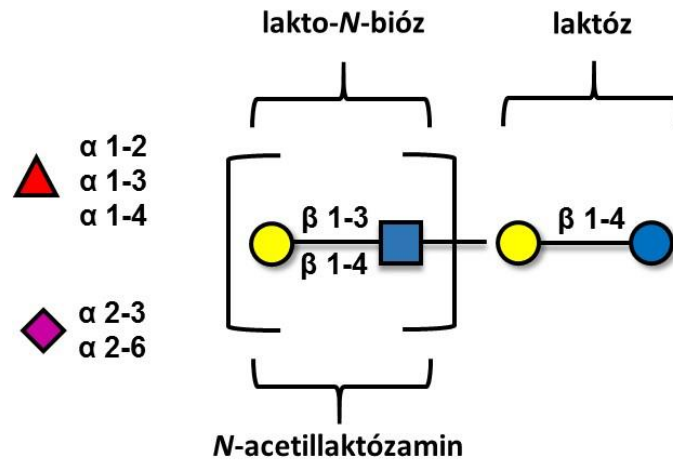
3.3. Az oligoszacharidok szerkezeti jellemzése

Az oligoszacharidok öt különböző monoszacharid egységet tartalmazhatnak, ezek a D-glükóz (Glc), D-galaktóz (Gal), *N*-acetilglükózamin (GlcNAc), L-fukóz (Fuc) és a szialsav (Sia, emberben kizárólag Neu5Ac formájában) (**1. ábra**) [5].



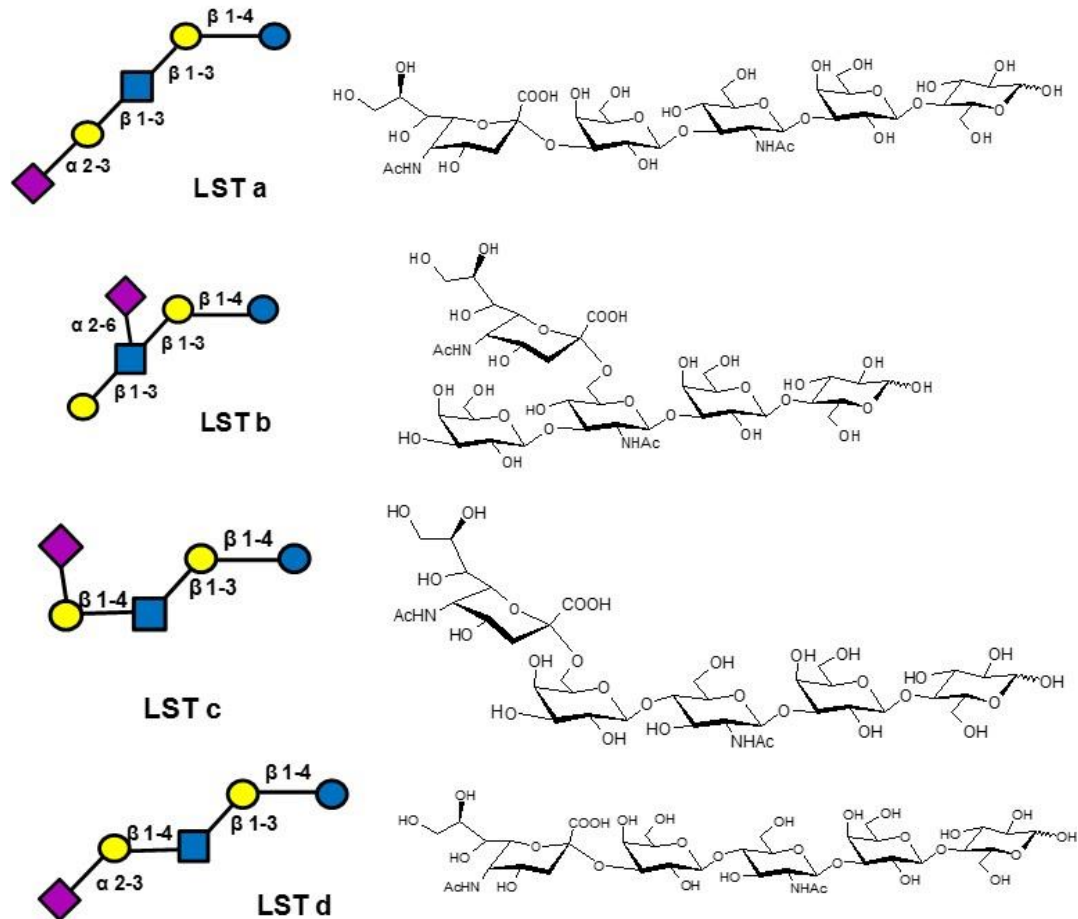
1. ábra - Az anyatej oligoszacharidokat felépítő monoszacharidok és a diszacharid laktóz szerkezete, valamint a Consortium for Functional Glycomics által elfogadott jelölése. A feltüntetett szerkezetek csak az egyik anomert jelölik [43].

Az eddig azonosított oligoszacharidok néhány kivételtől eltekintve mind laktóz egységgel rendelkeznek a redukáló végükön, melyhez β 1-3 és/vagy β 1-6 kötésben kapcsolódhat lakto-*N*-bióz (LNB: Gal(β 1-3)GlcNAc-), ezzel kialakítva az 1-es típusú láncot, vagy *N*-acetillaktózamin (LacNAc: Gal(β 1-4)GlcNAc-), ami a 2-es típusú láncok szerkezeti eleme. A lakto-*N*-bióz láncterminációt okoz, míg az *N*-acetillaktózaminhoz további lakto-*N*-bióz vagy *N*-acetillaktózamin egység kapcsolódhat. A β 1-3 helyzetű kötéssel kialakított lineáris struktúrák az úgynevezett para-oligoszacharidok, a β 1-6 kötéssel kialakított, elágazó szerkezetűek pedig az izo-oligoszacharidok.



2. ábra – Az oligoszacharidok általános szerkezete a monomerek kapcsolódási pozícióinak feltüntetésével.

Mindegyik struktúra további fukóz (α 1-2, α 1-3 és α 1-4 kötésben), illetve szialsav (α 2-3 és α 2-6 kötésekben) egységekkel egészülhet ki, így kialakítva azt a több, mint kétszáz egyedi oligoszacharid szerkezetet, amit napjainkig ismerünk (**2. ábra**) [44]. A legtöbb oligoszacharid számos izomer szerkezettel rendelkezik, ezt szemlélteti a monoszialillakto-*N*-tetraóz (LST) négy kapcsolódási izomerje (**3. ábra**) [1, 45].



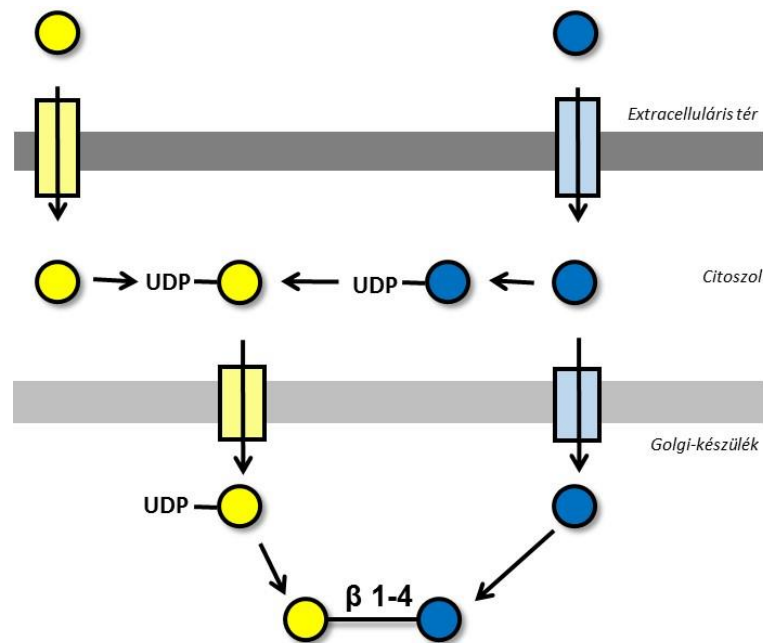
3. ábra – Az oligoszacharidok nagy szerkezeti diverzitást mutatnak: egy oligoszacharid számos kapcsolódási izomerrel rendelkezhet. Ezt jól reprezentálja a szialillakto-*N*-tetraóz, amely 4 kapcsolódási izomerrel rendelkezik: LST a, LST b, LST c és LST d izomerekkel.

A fukóz kapcsolódási pozíciója az egyén Lewis-vércsoportja által meghatározott, háromféle fukoziltranszferáz enzim függvénye. A szekretor (FUT2) egyének esetén a fukoziltranszferáz a galaktózon egy α 1-2 kötést, ezzel egy $\text{Fuc}\alpha$ 1-2 $\text{Gal}\beta$ 1-3 GlcNAc szerkezeti elemet hoz létre. Ebbe a genotípusba a fehér bőrű népesség 77%-a tartozik. A Lewis (FUT3) egyének esetén a fukoziltranszferáz enzim α 1-4 kötéseket hoz létre az GlcNAc egységen, ezzel a $\text{Gal}\beta$ 1-3[$\text{Fuc}\alpha$ 1-4] GlcNAc szerkezetű Lewis A vércsoport determinánst létrehozva. Ez a genotípus a népesség 20%-ára jellemző. Az említett két gén egymás mellett is manifesztálódhat, ekkor mindkét típusú kötés megtalálható az anyatej oligoszacharidokban. Az előző két enzim mellett egy harmadik típusú enzim α 1-3 kötéseket képes kialakítani az GlcNAc egységeken, ezzel $\text{Gal}\beta$ 1-4[$\text{Fuc}\alpha$ 1-3] GlcNAc szerkezeti elemeket létrehozva. Ebbe a csoportba (Lewis a–b– vércsoport) a népesség körülbelül 5%-a tartozik [5].

3.4. Az oligoszacharidok bioszintézise

Az oligoszacharidok anyatejben mért nagy koncentrációja ellenére a bioszintézisük teljes folyamatáról jelenleg nagyon kevés információval rendelkezünk. A minden egyes

oligoszacharidban megtalálható laktóz szintézisét a laktóz-szintáz komplex végzi. Ez a komplex két komponensből áll: az egyik az „A” protein, ami egy β 1-4 galaktoziltranszferáz (β 4GalT1), a másik pedig a „B” protein, α -laktalbumin. Az „A” protein önmagában a glikokonjugátumok képzésében az UDP-galaktózt egy terminális *N*-acetilglükózaminhoz kapcsolja, azonban a hormonális szabályozás alatt álló „B” protein jelenlétében az affinitása megnő a glükóz iránt, és így fő feladatává a laktóz szintézise válik [46]. A szintézis a Golgi-készülék zajlik, ahová a komponensek szabad glükóz és UDP-galaktóz formájában jutnak be (4. ábra).



4. ábra - Az oligoszacharidok bioszintézisének első lépése a laktóz szintézise, ami glükózból és UDP-galaktózból indul ki és a Golgi-készülékben, a laktóz-szintáz enzim (LS) hatására megy végbe. Azonban, hogy a laktózból miként alakulnak ki a komplex oligoszacharidok, napjainkig nem teljesen tisztázott.

A citoszolikus glükóz egy része UDP-glükózzá aktiválódik, majd UDP-galaktózzá konvertálódik, azonban a laktózbba beépülő galaktóznak nem csupán ez az egyedüli forrása [1]. Rudloff és munkatársai tizenegy laktáló nőnek ^{13}C -al jelölt galaktózt adtak orálisan, majd meghatározott időközönként tej- és vizeletmintát vettek tőlük, amelyeket HPTLC (high-performance thin layer chromatography), HPAEC (high-performance anion exchange chromatography) és gyors atom bombázásos tömegspektrometriás (FAB-MS) módszerekkel vizsgáltak. Az eredmények azt mutatták, hogy az orálisan adott galaktóz egy része közvetlenül beépült a laktózbba, anélkül, hogy előzetesen glükózzá alakult volna a májban, majd újra galaktózzá az emlőmirigyben [47].

Azonban amennyire jól ismert részleteiben a laktóz szintézise, annyira kevésbé ismert, hogy miként történik a laktózból a komplex oligoszacharidok képzése. Ennek egyik oka, hogy

az egyes fajok tejének összetétele jelentős eltérést mutat: az orvosi kísérletekben gyakran használt egerek teje mindössze 3'- és 6'-szialillaktózt tartalmaz, de a komplexebb, elágazó oligoszacharidok közül egyet sem [48]. Másik oka, hogy a humán emlőmirigyből készített sejtvonalak közül ezidáig nem sikerült olyan előállítani, amely képes lett volna oligoszacharidokat vagy egyáltalán laktózt szintetizálni. Így jelenleg két elképzelés van arra, hogy az előzetesen bioszintézissel előállított laktózból miként alakulnak ki a komplex oligoszacharidok. Az egyik teória szerint a fukozilált és/vagy szializált laktózamin egységek előzetesen szintetizálódnak a glikoproteineken vagy glikolipideken, és így egy egységként kapcsolódnak a laktózra. A másik hipotézis szerint a laktózamin egység monoszacharid egységenként, lépésről lépésre „tevédik rá” a laktózra [49]. Kobata szerint elképzelhető, hogy az oligoszacharidok elongációja és az elágazások kialakítása a poli-*N*-acetillaktózamin glikokonjugátumok szintézisének mintájára megy végbe. Így a lánchosszabbításért a különböző *N*-acetilglükózaminiltranszferázok (GlcNAcT) és galaktoziltranszferázok (GalT) felelősek. Ezen belül a lineáris lánchosszabbításért felelős enzim a β 3GlcNAcT (iGnT), az elágazások kialakításában a β 6GlcNAcT (IGnT), az 1-es típusú oligoszacharid láncok kialakításában a β 3GalT, a 2-es típusú oligoszacharid láncok kialakításában pedig a β 4GalT játszik fontos szerepet [50]. Azonban, hogy a valóságban melyik folyamat valósul meg, a mai napig nem tisztázott.

A különböző lehetséges alapvázakhoz további laktózamin egységek, fukóz és szialsav is kapcsolódhatnak. A fukozilációt a különböző fukoziltranszferázok (FUT) végzik. A FUT2 terminális helyzetű galaktózhhoz kapcsol α 1-2 helyzetben fukózt, így kialakítva többek között a 2'-*O*-fukozilaktózt (Fuc(α 1-2)Gal(β 1-4)Glc) vagy a lakto-*N*-fukopentaózt (Fuc(α 1-2)Gal(β 1-3)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc). A másik jól ismert fukoziltranszferáz a FUT3, ami szubterminális GlcNAc-hoz kapcsol hozzá α 1-4 helyzetű fukózt, ez játszik szerepet például a lakto-*N*-fukopentaóz II (Gal(β 1-3)[Fuc(α 1-4)]GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc) szintézisében. Végül pedig egy jelenleg még ismeretlen fukoziltranszferáz, a FUTx α 1-3 kötésben kapcsol fukózt a redukáló végen található glükózhoz vagy láncközi GlcNAc-hoz, ezzel kialakítva a lakto-*N*-fukopentaóz III-at (Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc) [1, 5].

A szializáció tekintetében kevesebb információval rendelkezünk: egyes ismert szerkezetek szializációjához a kötés kialakításában résztvevő enzim még nem ismert, más esetekben pedig lehetséges szializációkra nem találtak még biológiailag szintetizált szerkezetet és hozzá kapcsolódó enzimet. A két legkisebb, szialsavat tartalmazó oligoszacharid, a 3'- és 6'-szialillaktóz szintézisében a szialiltranszferázok (ST) közül a ST3Gal4 és a ST6Gal1 vesz részt [48]. Azonban, hogy ezek a szialiltranszferázok szerepet játszanak-e komplexebb

oligoszacharidok terminális helyzetű galaktózának szializálásában, egyelőre nem bizonyított. A szubterminális GlcNAc α 2-6 helyzetű szializálását a ST6GalNAc5 végzi, azonban csak abban az esetben, ha előzőleg a terminális Gal már α 2-3 kötésben szializált, ellenkező esetben az adott szerkezet nem képezi szubsztrátját az enzimnek. A szialillakto-*N*-tetraóz b éppen terminálisan nem szializált Gal mellett szubterminálisan α 2-6 helyzetben szializált GlcNAc-t tartalmaz [51]. Ez vagy egy újabb enzim létezését vagy pedig a ST6GalNAc5 szubsztrátspecificitásának kiterjesztését vetíti előre.

Az anyatej oligoszacharidok mesterséges előállítása ugyan még rendkívül kezdetleges stádiumban van, számos kutatócsoport foglalkozott az elmúlt években az egyes oligoszacharidok vagy akár oligoszacharid könyvtárak mesterséges szintézisével is. Ennek köszönhetően napjainkra az egyszerűbb tri- és tetraszacharid szerkezetek kemoenzimatikus szintézissel akár tápszergyártáshoz szükséges mennyiségekben is előállíthatók [1]. Azonban komplex szerkezetek szintézise elengedhetetlen az anyatej biológiai funkcióinak utánzásához, illetve az oligoszacharidok pontos funkcióinak feltárásához, így az elágazó szerkezetek szintézisére is történtek kísérletek. Schmidt és munkatársai oldatfázisú és szilárdfázisú szintézissel több elágazó szerkezetet alakítottak ki, többek között egy elágazó oktaszacharidot [52, 53]. Madsen és munkatársai tetraszacharidok „one-pot” szintézisét dolgozták ki. A kidolgozott módszerrel eredményesen előállították a pentaszacharid lakto-*N*-neofukopentaózt is [54]. Wang és munkatársai pedig kemoenzimatikus szintézissel egy 31 anyatej oligoszacharidból álló könyvtárat hoztak létre [55].

3.5. Az oligoszacharidok metabolizmusa

Az oligoszacharidok metabolizmusának vizsgálata az 1980-as évekre nyúlik vissza, azonban az analitikai módszerek fejlődésének köszönhetően az utóbbi években egyre pontosabb kép alakult ki az oligoszacharidok szervezetbeli sorsáról. *In vitro* kísérletekkel bizonyított, hogy az oligoszacharidok ellenállnak a gyomor alacsony pH-jának, az emberi nyálban lévő amilázoknak, sertésből izolált hasnyálmirigy amilázoknak, valamint a sertés vékonybeléből izolált (brush border) amilázoknak is [56, 57]. Így, ahogy az már az 1980-as évektől ismert, az enzimatis degradáció hiányának köszönhetően az oligoszacharidok jelentős része érintetlenül jut el a vékony- és vastagbélbe, majd a széklettel ürül a szervezetből [58-61]. További kutatások rávilágítottak, hogy az oligoszacharidok szervezetbeli feldolgozása és degradációja összefüggést mutat az utód korával, vércsoportjával és táplálásával. Ezen megállapításhoz az egyes csecsemők székletét, illetve az általuk elfogyasztott anyatej összetételét egy tömegspektrométerrel kapcsolt lézer indukálta fluoreszcens detektorral ellátott

kapilláris elektroforézis készülékkel vizsgálták [62-64]. Az összes lehetséges oligoszacharid szerkezet vizsgálata érdekében az anyák szekretor státusza és Lewis-vércsoportrendszere az összes lehetséges kombinációt lefedte. Az újszülött életének első 2 hónapjában a székletben megjelenő savas és semleges oligoszacharidok nagy hasonlóságot mutattak az általa elfogyasztott anyatej oligoszacharid-profiljával. Az ezt követő hónapokban (3-6 hónapos kor között) azonban fokozatosan jelentek meg a székletben az oligoszacharidok degradációs termékei és egyéb, Lewis-antigén determinánsokkal ellátott szerkezetek. Ezek egyértelműen gasztrointesztinális enzimatis hidrolízisre és konjugációra utaltak. Végül a hozzátáplálás megkezdését követően, amikor az anyatej mellett más táplálékok is beépültek a csecsemő étrendjébe, a széklet oligoszacharid profilja sokkal inkább a szilárd táplálékforrás oligoszacharid profiljával mutatott egyezést, mintsem az anyatej oligoszacharid profiljával [62].

A széklettel történő kiválasztás mellett az oligoszacharidok egy kis százaléka a vizeletben is megjelenik. Laktáló anyáknak ^{13}C -mal jelölt orális galaktóz bóluszt adva figyelték a tejmirigy által kiválasztott tej, az anya által kilélegzett CO_2 , valamint a csecsemő által kiválasztott vizelet ^{13}C -tartalmát. Az eredmények azt mutatták, hogy az utód által elfogyasztott ^{13}C -mal jelölt oligoszacharidok mennyiségének mintegy 1%-a választódott ki a vizelettel, ami egyúttal előrevetítheti az oligoszacharidok egyértelmű lokális hatásai mellett potenciális szisztémás hatásukat is (pl. gyulladáscsökkentő hatás, szisztémás fertőzések elleni védelem) [61, 65].

3.6. Az oligoszacharidok biológiai szerepe

Az anyatej oligoszacharidok kutatásának kezdeti fázisában az oligoszacharidokat egyértelműen a csecsemő egészséges bélflórájának kialakításában fontos bifidusz faktorként azonosították. Az elmúlt néhány évtizedben azonban az oligoszacharidok kutatása az új szerkezetek azonosítása mellett azok biológiai hatásainak vizsgálatára fókuszált. Ennek köszönhetően mára egyértelművé vált, hogy az oligoszacharidok sokkal több és komplexebb feladatot látnak el, mint csupán az egészséges bélflóra kialakítása. Ráadásul az utód számára biztosított számtalan biológiai funkció mellett az édesanya szervezetében is jótékony hatásúak lehetnek.

3.6.1. Prebiotikus hatás

Az oligoszacharidok az emberi szervezetben fennálló szinte összes enzimatis és pH-viszonynak ellenállnak, mennyiségük mindössze 1%-a bomlik le vagy szívódik fel a gasztrointesztinális traktusból, 99%-uk azonban érintetlenül jut el a vastagbélbe, ahol táplálékul

szolgálnak a különféle *Bifidobacterium*-fajoknak. Habár az anyatej oligoszacharidokat egységesen bifidusz faktornak nevezik, a kifejezés nem teljesen helytálló, mivel csak egyes, de nem az összes *Bifidobacterium* növekedését serkentik [1]. A probiotikus hatású *Bifidobacterium*-fajok közül csak a β -glikozidáz enzimmel rendelkezők (*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, *Bifidobacterium bifidum*) képesek az oligoszacharidok enzimatis emésztésére. Az emésztés során keletkezett termékeket energiaforrásként felhasználva ezen *Bifidobacterium*-fajok elszaporodnak a vastagbélben, így végsősoron az oligoszacharidok hozzájárulnak a csecsemő egészséges bélfloájának kialakításához [66, 67].

Ennek bizonyítására klinikai vizsgálatokat is végeztek, melyekben a tápszerekhez frukto- és galakto-oligoszacharidokat adtak. Az eredmények eltérést mutattak az oligoszacharidokat nem tartalmazó tápszerrel táplált csecsemők baktériumflórájához képest, azonban az anyatejjel tápláltakkal összehasonlítva nem mutattak szignifikáns eltérést [68, 69]. Az egészséges baktériumflóra pontos összetételét nem csupán az oligoszacharidok jelenléte vagy hiánya, de az oligoszacharidok összetétele is jelentősen befolyásolja. LoCascio vizsgálatai bizonyították, hogy a *Bifidobacterium longum* biovar. *infantis* – az általa termelt enzimek hasító-képességének megfelelően – a rövidebb láncú oligoszacharidok jelenléte mellett nő megfelelően [67].

3.6.2. Antiadhezió funkció

Az anyatej oligoszacharidok fontos feladata, hogy meggátolják számos vírus, baktérium vagy protozoon által okozott fertőzés kialakulását az újszülöttben [1]. A legtöbb kórokozó csupán akkor tudja megtámadni a szervezetet, ha kötődése biztosított a hordozó epitéliális felszínéhez, melynek alapja minden esetben egy receptor-ligand kölcsönhatás a baktérium felszínén található adhézió függő virulencia faktorok – többnyire lektinek, glikán-kötő fehérjék – és az epitél sejteken található komplement struktúrák között [5, 49]. Az anyatejben található oligoszacharidok szerkezetileg hasonlóak a sejt felszíni struktúrákkal, így vetélkedve velük, szolubilis receptoranalóggént megkötik a patogéneket, ezzel megakadályozva azok kapcsolódását az epitél sejtekhez és magát a fertőzést.

Napjainkra számos oligoszacharid esetében sikerült bizonyítani azok szerepét egyes kórokozók gátlásában. A *C. jejuni* esetében, amely a hasmenéses megbetegedések egyik leggyakoribb okozója világszerte, a 2'-*O*-fukozillaktóz (2-FL) mutat gátló hatást. Emberi intesztinális nyálkahártyán végzett ex vivo vizsgálatok azt mutatták, hogy a bakteriális célpont 2-es típusú H-antigénekhez (Fuc(α 1-2)Gal(β 1-4)GlcNAc-R) hasonlóan α 1-2 helyzetben fukozilált oligoszacharidok gátolták a *C. jejuni* kötődését [70]. A *C. jejuni* mellett más

kórokozók, például a calicivírus esetében is az α 1-2 kötésben fukozilált oligoszacharidok bizonyultak gátló hatásúnak. Morrow vizsgálatai során az α 1-2 kötésben fukózt tartalmazó oligoszacharidok mennyisége a különböző anyák tejében 0,8 és 20,8 mmol/l között változott. Azokban a csecsemőkben, akik olyan anyatejet kaptak, amelyben az α 1-2 kötésben fukozilált oligoszacharidok koncentrációja nagyobb volt, kevésbé alakult ki a hasmenéses megbetegedés közepes és súlyos formája. A *Campylobacter* okozta hasmenéses megbetegedés előfordulása azokban a csecsemőkben volt kisebb, akik nagy koncentrációban 2'-*O*-fukozillaktózt kaptak, a calicivírus okozta hasmenéses megbetegedés előfordulása pedig azokban a csecsemőkben volt kisebb, akik nagy mennyiségben lakto-*N*-difukohexaózt tartalmazó anyatejet kaptak [71]. Más intesztinális kórokozók, mint például a *V. cholerae* esetében a neutrális oligoszacharidok játszanak szerepet a fertőzés megakadályozásában [72].

Az anyatej oligoszacharidok azonban nem csak az intesztinális kórokozók elleni védelemben töltenek be fontos szerepet. Az anyatej a nazofaringeális nyálkahártyával és időnként a felső légutak egy részével is érintkezik, ezért az anyatejjel táplált csecsemőkben kisebb valószínűséggel fordul elő otitis media (középfülgyulladás). A kialakulásáért felelős *S. pneumoniae* és a *H. influenzae* kötődését a faringeális és a bukkális epitel sejtekhez szintén gátolták egyes oligoszacharidok [73]. Emellett a *Pseudomonas aeruginosa* és a respiratorikus szinciciális vírus (RSV) okozta légúti fertőzések is kevésbé alakultak ki az anyatejjel tápláltakban [74].

46 mannóz-rezisztens *Escherichia coli* törzset vizsgálva – melyek meningitist és neonatális szepszist okozhatnak – kiderült, hogy 9 törzs specifikus kötődést mutatott az α 2-3 kapcsolódású neuraminsavat tartalmazó oligoszacharidokra, vagyis a szialinsavat tartalmazó oligoszacharidok egy részére [75]. Az oligoszacharidok 1%-a, felszívódva a gasztointesztinális traktusból, eljutva a szisztémás keringésbe, majd a vizelettel kiválasztódva meggátolhatja a húgyúti fertőzéseket (*E. coli*) is [76, 77].

A globális problémát jelentő HIV-fertőzés egy fontos aspektusa a fertőzés anyáról gyermekre való terjedése, illetve ennek megakadályozása. Egyes vizsgálatok szerint a fertőzés átjutása elleni védelemben jelentős szerepet töltenek be az anyatej oligoszacharidok. Amíg a patogének egy része lektineket termel ahhoz, hogy kapcsolódhassanak a sejtfelszíni glikánokhoz, addig a HIV és más kórokozók glikánokat expresszálnak és a gazdasejt felszínén található lektinekhez kapcsolódnak a fertőzés kialakítása érdekében. A HIV esetében a célpont a dendritikus sejtek felszínén megtalálható DC-SIGN, amelyhez a gp120 glikoprotein segítségével képesek kötődni és ezáltal átjutni a nyálkahártya barrieren keresztül a szervezetbe. A kötődés alapját a DC-SIGN gp120-on található, magas mannóz-tartalmú régiók iránt mutatott

nagy affinitása képezi. Azonban a DC-SIGN ennél is nagyobb affinitást mutat a Lewis-vércsoportrendszer antigének ellen, amilyen szerkezeti elemeket az anyatej oligoszacharidok is tartalmaznak. Így, mivel az anyatejes táplálásban részesülő csecsemők nyálkahártyája az anyatej oligoszacharidokkal borított, ezek kompetitíven gátolják a gp120 kötődését a DC-SIGN-hoz, vagyis a HIV terjedését az anyáról az utódra [78].

A fentebb ismertetetteken felül számos további patogén (*Entamoeba histolytica*, influenzavírus A, B, C, norovírus, rotavírus stb.) esetében bizonyított az oligoszacharidok védő szerepe [1].

3.6.3. Immunmoduláns hatás

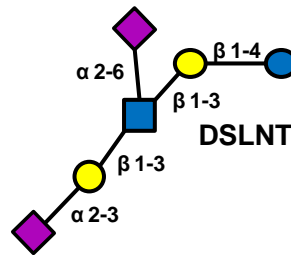
Az anyatej oligoszacharidok az antiadhezív funkció mellett a bélhámsejtek sejtválaszának módosítása révén is képesek védelmet nyújtani az enterális patogének ellen. Egyes oligoszacharidok jelenléte csökkentheti bizonyos enzimek génjének expresszióját, így azok mennyiségét is. Ennek megfelelően a 3'-szialillaktóz emberi epitél sejtvonalakon csökkenti bizonyos szialiltranszferázok (ST3Gal1, ST3Gal2, ST3Gal4) génexpresszióját, így a szialsavas sejtfelszíni glikánok mennyiségét, végsősoron pedig az ezen glikánokhoz kötődő enteropatogén *E. coli* kötődését is [1, 79].

Az oligoszacharidok emellett több különböző mechanizmussal válhatnak ki immunmoduláns hatást: a sejtciklus, illetve számos citokin termelődésének és immunsejt érésének befolyásolásán keresztül, valamint az enterálisan jelenlévő limfocita sejtekkel való kölcsönhatás révén. Emellett elképzelhető, hogy a gasztrointesztinálisan felszívódó hányad szisztémás immunmodulátor hatást vált ki [1]. A tetraszacharid LNnT és az elágazó láncú pentaszacharid LNFP III szerkezete megegyezik bizonyos parazita férgek felszínén expresszálandó glikánok szerkezeti elemeivel, amelyek fokozzák a peritoneálisan jelenlévő makrofág populáció jelenlétét [80]. Emellett igazolták, hogy az LNFP III *in vitro* serkenti a TNF α és az IL-10 szekrécióját és a makrofág aktivitást [81].

3.6.4. Nekrotizáló enterokolitisz elleni védelem

A nekrotizáló enterokolitisz (NEC) az egyik leggyakoribb és legsúlyosabb koraszülöttekben előforduló betegség, amely az 1500 g-nál kisebb súllyal született csecsemők 5-10%-nál jelentkezik, és mintegy negyedük halálát okozza. Sajnos a túlélő csecsemők jelentős hányadában is súlyos neurológiai szövődmények alakulhatnak ki. A betegség etiológiája máig nem ismert pontosan, a kezelése napjainkban még csak az érintett bélszakasz sebészi eltávolításával lehetséges, és ennek megfelelően sok hosszú távú egészségügyi következménnyel jár. Ahogy sok más betegség vonatkozásában, így a NEC esetében is kimutatták, hogy az

anyatejjel táplált csecsemőkben sokkal kisebb arányban alakul ki a kórkép, mint a tápszerrel tápláltakban. Így joggal feltételezhető, hogy az anyatejben található egy vagy több komponens meggátolja a NEC kialakulását. Egy san diego-i kutatócsoport patkányokon végzett kísérletekkel vizsgálta, mely oligoszacharidoknak lehet gátló szerepe a NEC kialakulásában. A több, mint 150 anyatej oligoszacharid közül sikeresen azonosítottak egyet, a diszialillakto-*N*-tetraózt (DSLNT) (5. ábra), amely szignifikánsan csökkentette a NEC kialakulását patkányokban, és a jövőben akár fontos komponensévé is válhat a modern tápszereknek [82].



5. ábra - A diszialillakto-*N*-tetraóz: *NeuAca2-3Galβ1-3 (NeuAca2-6) GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc* szerkezete a Consortium for Functional Glycomics által elfogadott jelölésrendszerben [43].

3.6.5. Agyi fejlődésben betöltött szerep

Bizonyított, hogy az oligoszacharidok egy kis hányada nem ürül ki az utód szervezetéből a széklettel, hanem a bélből felszívódva bejut a szisztémás keringésbe. Ezt alátámasztja a csecsemő vizeletéből is kimutatható kis mennyiségű oligoszacharid. Ezek a tények arra utalnak, hogy az anyatej oligoszacharidoknak akár szisztémás hatásaik is lehetnek, többek között hozzájárulhatnak az utód posztnatális agyi fejlődéséhez [5].

A születés utáni időszakban az utód gyors agyi fejlődésen esik át, emiatt nagymennyiségű glikolipidet (galaktocerebrozid, gangliozid stb.) igényel, ami a neuronok sejtmembránjának, illetve a mielinhüvelynek fontos építőeleme. A galaktocerebrozid szerkezetileg egy poláris fejcsoporttal rendelkezik, amit galaktóz alkot [83]. Azonban kérdéses, hogy az utód mája képes-e azt a nagy mennyiségű galaktózt biztosítani, ami az agyi fejlődéshez szükséges. Elképzelhető, hogy ezt az alapanyagigényt csupán a külsőleg, anyatejjel bevitt oligoszacharidok tudják fedezni, ezzel biztosítva, hogy a galaktóz ne váljon limitáló tényezővé a folyamatban [5, 84].

A születés után jelentősen növekszik az agyi szialsav mennyisége, ami egyértelműen jelzi, hogy a galaktóz mellett a szialsavnak is fontos szerepe lehet az agyi fejlődésben. Beépülve a gangliozidokba, hozzájárul az idegsejtek sejtmembránjának kialakításához. Ezt kívánja alátámasztani az a kísérlet, amely során 54, 0-4 hetes malacot vizsgáltak: egy csoportot természetes úton tápláltak, a többi csoport pedig különböző mennyiségű fehérjéhez kötött

sziálsavval dúsított, illetve sziálsavval nem dúsított tápszert kapott. Az eredmények azt mutatták, hogy a természetes úton táplált csoport rendelkezett a legjobb tanulási képességgel, de a sziálsavval dúsított tápszerrel tápláltaknál is különbséget fedeztek fel a sziálsav dóziséval arányosan [85]. Tápszerrel, illetve anyatejjel táplált csecsemők post mortem agyi vizsgálata során is azt tapasztalták, hogy a tápszerrel táplált csecsemők agyi sziálsav-koncentrációja jelentősen elmaradt az anyatejjel táplált csecsemők értékeitől [86]. Egy további vizsgálat igazolta, hogy az anyatejjel táplált csecsemők hét hónapos korukban magasabb intelligencia hányadossal rendelkeznek, mint a tápszeres táplálásban részesülő csecsemők, a 18 hónapos korban végzett kognitív teszteken pedig magasabb pontszámokat értek el [87].

3.6.6. Az anyai szervezetre gyakorolt hatások

Az oligoszacharidok biológiai hatásai bár nagymértékben, de nem kizárólagosan az újszülöttre terjednek ki. Az anyatejben megtalálható baktériumok fő feladata az újszülött bélrendszerének inokulációja az egészséges bélflóra kialakulásának érdekében, azonban a jótékony baktériumok mellett az anyatej időnként tartalmaz patogéneket is. Ilyen kórokozó lehet a *Staphylococcus*, ami a mastitisz (mellgyulladás) kialakulásának egyik fő kiváltó oka, és vörös duzzanattal, fájdalmas laktációval és esetenként lázzal járó állapotot eredményez. A 2'-FL esetében laboratóriumi körülmények között már igazolták, hogy egyes *Staphylococcus*-sejtvonalakhoz képes kapcsolódni [88]. Így elképzelhető, hogy az oligoszacharidok az anyában is szolubilis receptoranalógnaként szerepet játszanak a patogének inváziójának gátlásában, de emellett befolyásolhatják az emlőmirigy epitél sejtjeinek választát, illetve a lokális immunválaszt is [89]. Azonban potenciális védő funkciójuk mellett kedvezőtlen hatással is rendelkezhetnek azáltal, hogy táplálékul szolgálnak bizonyos patogéneknek, így elősegítve azok elszaporodását az emlőben. Az ismertetett lokális hatásaik mellett nem lehet kizárni, hogy az újszülötthöz hasonlóan az anyai szervezetben is rendelkeznek szisztémás hatással. A feltételezés alapjául szolgál, hogy a szülés előtt és közvetlenül utána az oligoszacharidok kimutathatók az anya vizeletéből, amely retrográd „szivárgást” feltételez [1, 90, 91].

3.7. Mesterséges táplálás: az oligoszacharidok pótlása, a tápszerek összetétele

A jelenleg forgalomban lévő csecsemő tápszereket két fő szempont alapján csoportosíthatjuk: életkor és típus szerint. Életkor szerint megkülönböztetünk újszülöttkortól adagolható anyatej-helyettesítő tápszereket, 6 hónapos kortól adható anyatej-kiegészítő tápszereket és 12 hónapos kortól javasolt junior gyerekitalokat. Ezek összetétele alkalmazkodik az adott életkorban szükséges tápanyag- és energiaigényhez, az anyatej-kiegészítő (elválasztó)

tápszerek a hozzátáplálás megkezdésével összhangban már tartalmaznak keményítőt vagy rizspépet is. Külön kategóriát képeznek a koraszülöttek számára előállított tápszerek, amelyek tipikusan magasabb energiatartalmúak és olyan összetevőket (pl. L-karnitin) is tartalmaznak, amelyek az anyatej-helyettesítő tápszerekben nem találhatók meg.

Egészséges csecsemők esetén a tehéntej alapú tápszerek megfelelő alternatívái az anyatejes táplálásnak. A tehéntej alapú tápszerek összetétele sem egységes: az egyes gyártók termékei eltérhetnek a fehérjék, a szénhidrátok és a zsírok mennyiségét és minőségét tekintve. Néhány gyártó pedig az emberi anyatej természetes fehérje-összetételének biztosításához a tehéntej 18:82 tejsavó fehérje:kazein arányát 48:52 – 60:40 arányra módosítja.

Azonban különböző egészségügyi okokból a tehéntej alapú tápszerek helyett speciális tápszeres táplálásra lehet szükség. Galaktozémiában és akut gasztroenteritisz során kialakuló másodlagos laktózintolerancia esetén laktózmentes tápszerek adása szükséges.

Jól ismert, hogy a tehéntejben megtalálható fehérjék a csecsemők 2-4%-ában ingerlékenységgel, hányással, hasmenéssel, kiütésekkel járó allergiás reakciót váltanak ki. A tejfehérje-allergia elkerülése érdekében úgynevezett hipoallergén tápszerek adása javasolt. Ezek részlegesen vagy extenzíven (szemielementáris tápszerek) hidrolizált fehérjéket tartalmaznak, amelyek így nem váltanak ki allergiás reakciót. A hipoallergén tápszerek indikációja lehet ezen felül, ha a családon belül atópiás dermatitisz halmozott előfordulása figyelhető meg, mert bizonyított, hogy így annak kialakulása megelőzhető vagy késleltethető. Táplálékfehérje iránti túlérzékenység esetén javasolható egyéb fehérje, például szója, rizs vagy szentjánoskenyérfa magfehérje bázisú tápszerek alkalmazása is. Azonban a szójaalapú tápszerek esetén a gyermekek 10-14%-ában keresztreakció figyelhető meg a szójafehérje és a tejfehérje szerkezeti hasonlóságai miatt. Amennyiben a hipoallergén vagy egyéb fehérjealapú tápszerek sem nyújtanak megoldást a tejfehérje-allergia ellen, akkor aminosav-alapú tápszerek adása válhat indokolttá. A speciális tápszerek körébe tartoznak még az antireflux tápszerek, amelyek a szentjánoskenyérfa liszt vagy keményítő tartalmuknak köszönhetően sűrűbb állagúak és csökkentik a gyomortartalom nyelőcsőbe való visszaáramlását. Emellett léteznek még különböző anyagcsere-betegségekre (fenilketonuria, tirozinémia) adaptált és utolérő-fejlődést biztosító (magas fehérje- és energiatartalmú) csecsemő tápszerek is [92-97].

Az anyatej oligoszacharidok kiterjedt vizsgálataira a tápszergyártók is felfigyeltek és a jelenleg kapható tápszerek összetételét az oligoszacharid-összetétel szempontjából is próbálják az anyatej összetételéhez igazítani. Azonban jelenleg a tápszerek oligoszacharid igényének egyedüli természetes forrását a háziállatok teje biztosíthatná, de ezek oligoszacharid-tartalma és diverzitása csekély. Így az iparilag szükséges mennyiségű oligoszacharid-keverék előállítása

hatalmas mennyiségű alapanyagot és energiaráfordítást igényelne, ráadásul még így sem tudná teljes mértékben leképezni az anyatej oligoszacharid-összetételének változatosságát. Jelenleg az anyatej oligoszacharidok funkcióinak pótlása alternatív, nem-humán oligoszacharidokkal: galakto- (GOS) és frukto-oligoszacharidokkal (FOS) történik. Az ilyen prebiotikus tápszerek 9:1 arányban tartalmazzák a galakto- és fruktooligoszacharidokat, amelyek molekulatömeg eloszlásukban az anyatej oligoszacharidokkal összevethetők [6].

A galakto-oligoszacharidok 3-10 monomer egységből felépülő galaktóz (Gal) oligomerek, melyek szintézise laktózból enzimatis transzglykozilációval, β -galaktozidázokkal történik. Az így keletkező galakto-oligoszacharidok az enzim specificitásától függően tartalmazhatnak β 1-4, β 1-6, β 1-2 vagy akár β 1-3 kötéseket is [1].

A frukto-oligoszacharidok főként a β 2-1 kötést tartalmazó, inulin-típusú fruktóz oligomerek közé tartoznak. Gyártásuk során először izolálják őket különböző *Compositae*-fajokból, mint a cikória, majd az izolált, 2-60 monomer egységet tartalmazó polimereket endoinulináz enzim segítségével hasítják kisebb oligomerekké. Előállításuk másik útja a transzfruktoziláció β -fruktozidázok segítségével, ahol szubsztrátként a szacharóz szolgál [1, 98].

A jelenleg kapható „csúcstápszerek” a fent említett anyagoknak köszönhetően a piac egyik legfelkapottabb képviselőivé váltak, de fontos megjegyezni, hogy a prebiotikus hatású galakto- és frukto-oligoszacharidok nem találhatóak meg természetesen az anyatejben, ráadásul sem fukózt, sem sziálsavat nem tartalmaznak. Nyilvánvalóan a szerkezeti különbségek miatt nem tudnak tökéletes alternatívái lenni az anyatejes táplálásnak, bár bizonyítottan előnyös hatásokkal is rendelkeznek. Elősegítik a bélhámsejtek proliferációját és differenciációját, gátolják egyes patogének elszaporodását a vastagbél kémhatásának savanyításával, továbbá az ozmotikusan aktív, meg nem emésztett oligoszacharidok lágyítják a székletet. Emellett a szerkezetbeli különbségük miatt befolyásolják a bélflóra összetételét, csökkentik az első hat hónapban az atópiás dermatitisz előfordulását, a visszatérő allergiák manifesztációját és a fertőzéseket az első két életévben [1, 99-101]. Természetesen a hosszú távú előnyeik és hátrányaik egyelőre nem ismertek, ezek megállapítása további vizsgálatokat igényel.

3.8. Az oligoszacharidok analitikai vizsgáló módszereinek áttekintése

Az anyatej oligoszacharidok kutatása az 1900-as évekre nyúlik vissza, amikor a magas csecsemőhalandósággal összefüggésben a kutatók felfigyeltek arra a tényre, hogy az anyatejjel táplált csecsemők túlélési esélyei jelentősen magasabbak nem anyatejjel táplált társaikhoz képest [1]. Azóta számos analitikai technika segítségével próbálják a kolosztrumban és az

anyatejben megtalálható oligoszacharidokat karakterizálni, azonosítani és mennyiségileg jellemezni [102]. Ez az individuális oligoszacharidok biológiai funkciójának azonosításához és ezáltal korszerűbb tápszerek előállításához egyaránt elengedhetetlen.

Habár a különböző cukrok analízise egy külön tudományággá nőtte ki magát (glikomika), szénhidrátok komplex biológiai mintákból történő analízisére a mai napig nincs általánosan alkalmazható módszer. Ennek egyik oka a biológiai minták rendkívül komplex összetétele, ami hosszasan, több lépésből álló mintaelőkészítést igényel, emellett nehezíti az a tény, hogy a szacharidok jelentősen eltérő koncentrációban találhatók meg a mintákban, sok esetben rendkívül kis mennyiségben. További analitikai kihívást okoz a monomerek változatos kapcsolódási lehetőségéből adódó nagy szerkezeti diverzitás, polidiszperzió és a bioszintézisből adódó mikroheterogén szerkezetek jelenléte. Detektálásuk a kromofór csoportok hiánya miatt abszorbanciamérésen alapuló módszerekkel nem lehetséges. Emellett az oligoszacharidok redukáló végén megtalálható glükóz egység α/β anomériája kromatográfiásan sok esetben két csúcsot, NMR spektroszkópiával pedig jelsorozat duplázódást eredményez, ami tovább nehezíti vizsgálatukat [103].

Anyatej minták esetén külön figyelmet igényel a rendelkezésre álló minta kis mennyisége, illetve a mintákban jelenlévő, az oligoszacharidokhoz képest nagyságrendekkel nagyobb mennyiségben előforduló diszacharid laktóz. Az oligoszacharidok izolálásának első lépése a fehérjék és zsírok eltávolítása az anyatejből. Kloroformos-metanolos folyadék-folyadék extrakciót követően centrifugálással a zsírokat kioldó kloroformos fázis és a kicsapódott fehérje egyaránt elválasztható a vizes-metanolos oldatrésztől, amelyben az oligoszacharidok mellett egyéb hidrofil kismolekulák (aminosavak, citrát stb.) is megtalálhatók. Liofilizálást követően méretkizárásos kromatográfiát (géliszűrés) alkalmazva az oligoszacharidok elválaszthatók a nagy mennyiségben jelenlévő laktóztól. Az elválasztást követően nátriumbórhidrides redukcióval alditol formává alakíthatók az oligoszacharidok, megszüntetve a mutarotáció okozta alfa- és béta-anomériát, ami szükségtelenül megnehezítené az amúgy is komplex keverék kromatográfiás vizsgálatát [15]. A rendkívül időigényes, többlépéses mintaelőkészítés gyorsabbá tétele jelentősen egyszerűsítheti az anyatej oligoszacharidok vizsgálatát. 2017-ben Wu és mtsai. egy 96-lyukú plate-alapú, nagy áteresztőképességű mintaelőkészítési protokollt dolgoztak ki a hagyományos mintaelőkészítés alternatívájaként [104]. Azonban ez a módszer önmagában csak egy anyatej oligoszacharid keverék előállítását biztosítja, a rendkívül közeli szerkezetek elválasztásához és ezáltal a mennyiségi meghatározáshoz továbbra is szükséges a megfelelő elválasztástechnika alkalmazása.

Az anyatej oligoszacharidok analitikája az esetek jelentős többségében valamilyen tömegspektrometriával kapcsolt folyadékkromatográfiás módszerrel történik [2, 15, 82, 105], de az irodalomban megtalálható néhány mágneses magrezonancia spektroszkópián (NMR) alapuló [106-108], illetve kapilláris elektroforézissel végzett tanulmány is [109-111].

3.8.1. Elválasztástechnika

Az anyatej oligoszacharidok mennyiségi jellemzéséhez, valamint szerkezetük tömegspektrometriával történő meghatározásához elengedhetetlen a megfelelő elválasztástechnikai módszer megválasztása. Ennek alkalmasnak kell lennie a poláris, sok elágazást is tartalmazó, izomer szerkezetű – pl. kapcsolódási izoméria – oligoszacharidok komplex keverékét frakcionálni [112].

Az elválasztástechnikai módszerek között a magas pH-jú anioncserélő kromatográfia (HPAEC) pulzáló amperometriás detektorral (PAD) kapcsolva egyaránt alkalmas a neutrális illetve a savas karakterű oligoszacharidok elválasztására, valamint alkalmas lehet számos izomer szerkezet elválasztására is [113, 114]. Azonban az előzetes mintaelőkészítés, különösképpen, ha tömegspektrometriával kapcsolt a módszer, rendkívül időigényessé teszi azt [115, 116]. Mindemellett esetenként szükséges lehet a semleges és a savas karakterű oligoszacharidok előzetes elválasztása, ami tovább növeli az analízisidőt [117]. Fordított fázisú HPLC alkalmazása az oligoszacharidok előzetes derivatizációját igényli, mivel a natív szerkezetek ezen az állófázison nem rendelkeznek retencióval. A származékképzés tipikusan megszünteti a mutarotációt és az ebből adódó esetleges csúcskettőződést, valamint lehetővé teszi kromofór csoportok létrehozását, ezáltal az UV-detektálást. Oligoszacharidok esetén gyakran alkalmazott származékképzők az alábbiak: 1-fenil-3-metil-5-pirazolon, 2-aminopiridin, p-aminobenzoesav, antranilsav, p-nitroanilin, etil-para-amino-benzoát, 2-aminoakridon [117-124]. A fordított fázisú HPLC részben ugyan képes az izomer szerkezetek elválasztására, azonban a nagyon közeli szerkezetekre nem képes megfelelő felbontást biztosítani, ami az anyatej oligoszacharidok analízisekor nagy hangsúlyt kap [124-126]. Ugyan a fordított fázisú kromatográfiához képest jóval kisebb arányban, de normál fázisú kromatográfiával történő anyatej oligoszacharid vizsgálatra is van példa az irodalomban [122, 123]. A hidrofil interakción alapuló kromatográfia (HILIC) az anyatej oligoszacharidok analitikájában meglehetősen újkeletű technika. A HILIC esetén az oligoszacharidok fluoreszcens detektálását a 2-aminobenzamiddal történő származékképzés tette lehetővé. A HILIC módszerre általában elmondható, hogy az izomer szerkezetek nem megfelelő elválasztása nehézséget jelent, viszont a szíálsav-tartalmú izomerek elválasztására jó eredményekkel szolgált [117, 127]. A micelláris elektrokinetikus kromatográfia (MEKC) jó

izomer elválasztást biztosít a szialsav-tartalmú oligoszacharidokra, azonban a töltött részecskék jelenlétének szükségessége miatt semleges anyatej oligoszacharidok vizsgálatára nem alkalmas, ami nagy limitáló tényező a módszer gyakorlati alkalmazhatóságában [117, 128, 129]. A porózus grafit (PGC) állófázisok egyedülálló izomer elválasztást képesek biztosítani, azonban az α -/ β -anomerek nem kívánt elválasztása nehezíti az analízist. Ez a jelenség a redukáló cukrok elválasztását tovább bonyolítja, mivel az anomerek elválásával az elválasztandó részecskék száma duplájára nő, a jel/zaj arány pedig romlik. Az anomerek kromatográfiás szétválásának kiküszöbölésére széles körben alkalmazott módszer a redukáló láncvég borohidrides redukciója [102, 104, 112, 130].

A számos folyadékkromatográfiás módszer mellett ezidáig az anyatej oligoszacharidok azonosítására és mennyiségi jellemzésére gázkromatográfiás módszer nem került kidolgozásra. Annak ellenére, hogy a cukrok analitikájában nem a gázkromatográfia az elsődleges választás, monoszacharidok vizsgálatára meglehetősen elterjedt [131-133]. A növényanalitikában néhány kutatócsoport már kifejlesztett olyan gázkromatográfiás módszereket, amelyek alkalmasak mono-, di- és akár triszacharidok azonosítására is. Bebizonyították, hogy a gázkromatográfia alkalmas különböző növényekről (akác, hárs, repce, napraforgó és fenyő) gyűjtött mézekben monoszacharidok (fruktóz, glükóz és inozitol), diszacharidok (szukróz, maltóz, genciobióz és palatinóz), valamint triszacharidok (raffinóz, maltotrióz és panóz) azonosítására és mennyiségi meghatározására. A GC-MS vizsgálatokhoz a szacharidokat előzetesen trimetilszilil és trimetilszilil-oxim származékokká alakították [134, 135].

3.8.2. Kapcsolt módszerek

Az anyatej oligoszacharidok kizárólag elválasztástechnikán alapuló vizsgálata esetén azonosításukhoz standardok szükségesek a retenciós idők összevetése céljából, azonban ez sok esetben nem áll rendelkezésre és/vagy rendkívül drága. Emellett figyelembe véve, hogy az egyes minták összetétele jelentősen eltérhet, az elúció nem teljesen megegyező az egyes futások között, és még standard anyagok esetén sem zárható ki a koelúció, így a kapcsolt technikák alkalmazása jóformán elengedhetetlen a jobb azonosíthatóság érdekében [117]. A kromatográfiás elválasztások különböző típusú tömegspektrométerekkel való kapcsolása tovább gazdagítja az anyatej oligoszacharidok analitikai vizsgálati lehetőségeit. A minta ionizációja leggyakrabban elektroporlasztásos ionizációval történik (ESI) pozitív vagy negatív módban [123, 136, 137]. Azonban gyakran alkalmazott ionizációs mód a mátrix-segített lézer deszorpció/ionizáció (MALDI) is, különösképpen HPAEC elválasztást követően, habár a MALDI esetében a minta tömegspektrometriás vizsgálatra való előkészítése további lépésekkel (mátrix-minta oldat elkészítése, rászárítása a mintatartóra stb.) bővül [113, 114]. Egyedülálló

szerkezetigazolást biztosít a mátrix-segített lézer deszorpciós/ionizációs Fourier transzformációs ion ciklotron rezonancia tömegspektrometria (MALDI-FTICR-MS), a kvadrupól-repülési idő analizátoros tömegspektrometria (QTOF-MS), a MALDI-TOF-MS és a kvadrupól-ioncsapda tömegspektrometria (QIT-MS) [102].

A mikrofluidikai technológiának köszönhetően a chip-alapú LC-módszerek elterjedése a hagyományos LC-rendszerekhez képest forradalmasította a kismolekulás analitikai vizsgálatokat. A polimer mikrochipre integrált kapilláris és így a csőcsatlakozások megszűnése, illetve a nanospray alkalmazása a módszerek nagy érzékenységet és könnyű automatizálhatóságot kölcsönöz, így a glikomika egyik legnagyobb teljesítőképességű analitikai kapcsolt technikájává vált. A HPLC-Chip rendszerek detektoraként alkalmazott repülési idő analizátorral ellátott tömegspektrométer (MS/TOF) pedig a rendkívüli érzékenységgel és nagy pontosságú tömegmérésével a kimutathatósági határt akár a femtomol tartományba is képes leszorítani [2, 15]. Ruhaak és mtsai. kihasználva ezt az új technológiát, egy nano-LC PGC chip TOF-MS módszerrel, pozitív ionizációs módban több, mint 200 anyatej oligoszacharid szerkezetet választottak el egymástól. A kidolgozott módszerrel a semleges és a szialsav-tartalmú oligoszacharidokat egy rendszerben tudták elválasztani egymástól. Anyatej könyvtár segítségével pedig, amely tartalmazza az adott oligoszacharid retenciós idejét, tömegét és fragmentációs mintázatát, azonnali azonosítást értek el [44, 105, 117].

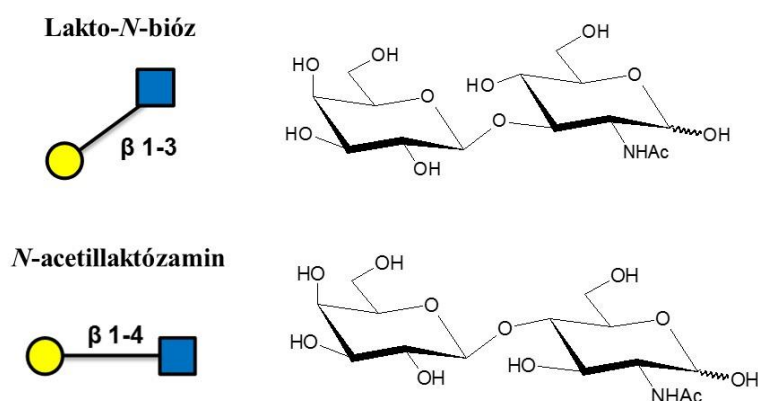
Mindezek ellenére a tömegspektrometria sem képes minden szerkezetvizsgálati problémát egyértelműen megoldani. Az oligoszacharidok szerkezete igen komplex, azonos atomi összetételhez rendkívül sok, igen különböző szerkezet tartozhat, leggyakoribb példa erre a pozicionális izomerek jelenléte. Tekintettel arra, hogy a szializációnak, fukozilációnak, de a redukáló végen található laktózzal induló lánchosszabbító lépéseknek is számos lehetséges helye van, nem meglepő, hogy bizonyos oligoszacharidok esetében az izomerek száma messze meghaladhatja a tízet is [2]. A mai modern protokoll a következők szerint történik: az oligoszacharidokat először HPLC segítségével frakciókra gyűjtik, majd minden egyes frakcióból HPLC-Chip/TOF MS segítségével retenciós időket határoznak meg, illetve MALDI-FT-ICR MS segítségével rendkívül pontos móltömeg meghatározást végeznek. Ezt követően minden egyes komponens tandem MS tömegspektrumát felvéve, a fragmentációs mintázatból nagy eséllyel megállapítható a kérdéses szerkezetek szekvenciája. Az izomer szerkezetek pontos elágazási helyeinek feltérképezéséhez lépésről lépésre történő exoglikozidáz hasításokat követő MS vizsgálatokra van szükség. Ezen módszer segítségével teljes könyvtárat hoztak létre az anyatejben található oligoszacharidokról, melyben – ahogy fentebb már említésre került - megtalálható az egyes oligoszacharidok retenciós ideje, pontos tömege és tandem MS

tömegspektruma, ezzel megkönnyítve a későbbi azonosításukat [2, 15]. Természetesen ehhez mindenben követni kell a protokollt, így nem kerülhető ki a hazánkban még szinte elérhetetlennek tűnő műszeregyüttes alkalmazása sem.

4. Célkitűzések

4.1. A diszacharid építőelemek vizsgálata

Doktori munkám során célul tűztük ki az anyatej oligoszacharidokat felépítő két legfontosabb diszacharid egység, az LNB és a LacNAc kimutatását és mennyiségi meghatározását anyatej mintákból. Ezek közül az LNB az 1-es típusú anyatej oligoszacharidok kialakításában fontos, és beépülése láncterminációt eredményez, amíg a LacNAc sokkal inkább a 2-es típusú anyatej oligoszacharidokra jellemző, és beépülése a szacharid váz továbbépülését segíti elő [1]. Ezek a rendkívül közeli diszacharid struktúrák mindössze a galaktóz és az *N*-acetilglükózamin közötti kötés helyzetében térnek el: amíg a LacNAc esetében a két monoszacharidot egy β 1-4 kötés kapcsolja össze, addig az LNB esetében a két építőegység között egy β 1-3 glikozidos kötés található meg (6. ábra). Ezek az apró szerkezeti eltérések rendkívül hasonló kromatográfiai tulajdonságokat eredményeznek, ezért elválasztásuk kihívást jelent. Ezen felül azonos molekulatömeggel rendelkeznek (383,4 g/mol) és UV-elnyelésük csekély.



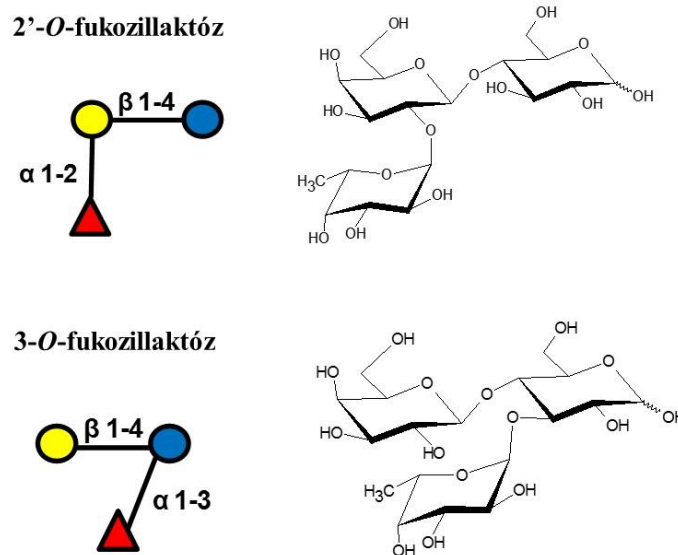
6. ábra - Az oligoszacharidok felépítésében fontos diszacharidok: a lakto-*N*-bióz (LNB) és az *N*-acetillaktózámin (LacNAc) szerkezete, és a Consortium for Functional Glycomics által elfogadott jelölése.

Feltételezésünk szerint a szabad formájú LNB és LacNAc előfordulása a kolosztrumban és az anyatejben nem lehet véletlen. Mivel az emberi szervezetben megtalálható biomolekulák bioszintézisét a természetes szelekció határozza meg, így szükségtelen molekulák szintézise felesleges energiafelhasználáshoz vezetne [2]. Ezért, ha az LNB és a LacNAc jelenléte kimutatható az anyatej mintákból, az fontos biológiai funkciót vetíthet elő és így jelentős célmolekulákká léphetnek elő: kimutatásukkal közelebb kerülhetünk az anyatej oligoszacharidok bioszintézisének megértéséhez vagy jelenlétük akár teljesen új biológiai funkciót is jelezhet. Azonosításuk és mennyiségi meghatározásuk mellett a tápszergyártók körében is jelentőséggel bírhat, hiszen az anyatej újabb és újabb összetevőinek azonosítása

lehetővé teszi egy, az anyatej tulajdonságaira és összetételére leginkább hasonlító tápszer előállítását. A potenciális biológiai jelentőségük mellett a kihívást jelentő analitikai probléma megoldása is ezen célmolekulák vizsgálata felé irányított minket.

4.2. Triszacharidok vizsgálata gázkromatográfiával

Doktori munkám további célkitűzése egy olyan GC-MS módszer kidolgozása volt, amely lehetővé teszi a 2'-*O*-fukozillaktóz (2'-FL) és a 3-*O*-fukozillaktóz (3-FL) azonosítását és mennyiségi meghatározását anyatej mintákból (7. ábra). A 2'-FL a leggyakoribb oligoszacharid az anyatejben (kivéve a nem-szekretor anyák tejét, amelyben az α 1-2 fukoziltranszferáz enzim hiánya miatt nincs jelen a 2'-FL). A kapcsolódási izomer 3-FL sokkal kisebb mennyiségben található meg az anyatejben, azonban még így is nagy mennyiséget tesz ki a teljes oligoszacharid mennyiséget illetően.



7. ábra – Az anyatejben megtalálható két, fukozil egységet tartalmazó triszacharid, a 2'-*O*-fukozillaktóz és a 3-*O*-fukozillaktóz szerkezete, és a Consortium for Functional Glycomics által elfogadott jelölése.

Jelentős mennyiségük mellett a lehetséges biológiai funkcióik miatt is fontos célmolekuláknak bizonyulnak. A prebiotikus hatás, valamint az enterohepatikus *E. coli* és a *P. aeruginosa* kórokozók gátlása mindkét triszacharidra jellemző, miközben a *C. jejuni* és a *Salmonella enterica* serovar. *fyris* gátlása csupán a 2'-FL-ra jellemző [1, 138]. Emellett a 2'-FL képes gátolni számos Enterobacteriaceae törzs növekedését, amelyek hozzájárulnak a bélrendszer gyulladásához és a nektorizáló enterokolitisz (NEC) kialakulásához [139]. A tápszergyártók manapság nagy erőfeszítéseket tesznek, hogy az anyatej összetételéhez és tulajdonságaihoz leginkább hasonlító tápszerek kerüljenek a piacra. Mivel a 2'-FL és a 3-FL kémiai és enzimatisz szintézise is relatíve egyszerű a komplexebb oligoszacharidokkal

összehasonlítva, ráadásul jelentős mennyiségben található meg az anyatejben, ezért a tápszergyártók első és legfontosabb célmolekulái közé tartoznak. Egy 2015-ben, az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság Táplálékkiegészítők, Táplálás és Allergia Munkabizottsága által kiadott, a 2'-FL biztonságosságáról szóló tudományos vélemény szerint pedig a 2'-FL a megadott indikációkban és mennyiségben biztonságosan alkalmazható [140].

5. Módszerek

5.1. Lakto-*N*-bióz és *N*-acetillaktózamin vizsgálata

5.1.1. Anyatej minták, standard anyagok és reagensek

Az anyatej minták egészséges önkéntesektől származnak a szülést követő időszakból. A mintákat steril mintatartókba gyűjtöttük és felhasználásig -40 °C-on tároltuk. Az LNB és LacNAc standardokat részben a Glycom Hungary Kft.-től kaptuk, illetve az Elicityl SA (Crolles, France) és a Carbosynth Limited (Berkshire, UK) cégektől vásároltuk. A Bio-Rad Bio-gel P2 méretkizárásos kromatográfiás oszloptöltet a Bio-Rad Laboratoires Inc.-től (Hercules, California, USA) származott. A 6 ml-es Dionex SolEx 535 nem-pórusos grafitizált szén alapú szilárdfázisú extrakciós oszlopokat a Thermo Fisher Scientific Inc.-től (Waltham, MA, USA) szereztük be. A reagens nátrium-hidroxid, 1-fenil-3-metil-5-pirazolon (PMP), hidrogén-klorid, diklórmétán, metanol, acetonitril, kloroform, hangyasav, fenol, kénsav, nátrium-azid és nátrium-bórhidrid, valamint az elúcióhoz használt metanol és acetonitril eluensek és az ammónium-acetát mind a Sigma-Aldrich Chemie GmbH-től (Bedford, MA, USA) származik.

5.1.2. Műszerek

A HPLC méréseket, valamint a validálást egy G1379A gáztalanítóval, G1312A bináris gradiens pumpával, G1329A automata mintavevővel és egy G1316A oszloptermosztáttal felszerelt Agilent 1100 HPLC rendszeren végeztük (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). A tömegspektrometriás méréseket egy Agilent 6410B hármas kvadrupól analízátorral és elektroporlasztásos ionizációs (ESI) ionforrással felszerelt készüléken végeztük (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA).

5.1.3. HILIC módszer

A kromatográfiás elválasztáshoz egy Phenomenex Luna HILIC (5 µm; 250 x 4,6 mm) oszlopot (Glycom Hungary Kft.-től kaptuk) alkalmaztunk. A méréseink során acetonitril/metanol és víz különböző arányú elegyeit használtuk eluensként az izokratikus elválasztáshoz, 25 °C oszloptér hőmérséklet és 1 ml/perc áramlási sebesség mellett. A tömegspektrometriás detektálást pozitív ionizációs módban végeztük.

5.1.4. RP-HPLC módszer

A szacharidok fordított fázisú kromatográfiás vizsgálatához származékképzést végeztünk. A származékképzés első lépéseként 1-15 mg szacharidot oldottunk 10 ml 0,3 M

NaOH oldatban. Az így készült szacharidoldat 50 µl-ét összekevertük 75 µl 0,5 M PMP-oldattal, majd 70 °C-on 30 percig melegítettük. Szobahőmérsékletre való hűtés után 75 µl 0,3 M HCl oldattal semlegesítettük és 100 °C-on vákuum alatt szárazra pároltuk. A száraz mintát 1 ml desztillált vízben visszaoldottuk és háromszori 1 ml-es kirázást végeztünk diklórmetánnal a reagálatlan PMP eltávolítása céljából. A visszamaradt vizes fázist ezt követően kromatográfiásan vizsgáltuk [141]. Eluensként acetonitrilt és 0,1 M ammónium-acetát keverékét használtuk, 1 ml/perc áramlási sebesség és 25 °C-os oszloptér hőmérséklet mellett, gradiens elúciós program szerint (**3. táblázat**). Állófázisként egy TSK gel ODS - 100 V (5 µm; 250 x 4,6 mm) oszlopot használtunk (Glycom Hungary Kft.-től kaptuk). A detektálást UV-látható diódasoros detektor segítségével 245 nm-en végeztük, illetve tömegspektrometriásan is monitoroztuk a megjelent csúcsok m/z értékét ($[M+H]^+ = m/z 714$).

3. táblázat - Az LNB és LacNAc elválasztásához alkalmazott fordított fázisú kromatográfiás rendszer paraméterei.

| t (perc) | ACN (%) | 0,1 M CH ₃ COONH ₄ (%) |
|----------|---------|--|
| 0,0 | 15 | 85 |
| 35,0 | 22 | 78 |
| 45,0 | 22 | 78 |
| 45,2 | 15 | 85 |
| 50,0 | 15 | 85 |

5.1.5. PGC

A kromatográfiás elválasztáshoz egy Hypercarb (5 µm; 100 x 2,1 mm) oszlopot (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) használtunk. Az oszlopot állandó, 25 °C-os hőmérsékletre temperáltuk. A mozgófázisként 0,1% V/V hangyasavat tartalmazó vizes oldatot, *B* mozgófázisként pedig metanolt használtunk. Az LNB és a LacNAc elválasztása egy izokratikus elúciós módszerrel történt 3% *B* mozgófázis, 0,5 ml/perces áramlási sebesség és 12 perces analízisidő mellett. A retenciós idők megfelelő reprodukálhatósága érdekében minden egyes analízis előtt egy mosási protokollt futtattunk le, amelynek paraméterei a **4. táblázatban** láthatók. Az áramlási sebesség 0,5 ml/perc, az automata mintavevő hőmérséklete 5 °C volt.

4. táblázat – Az LNB és LacNAc analízisekor alkalmazott gradiens mosási protokoll paraméterei.

| t (perc) | 0,1% V/V HCOOH (%) | MeOH (%) |
|----------|--------------------|----------|
| 0,0 | 97 | 3 |
| 0,1 | 10 | 90 |
| 20,0 | 10 | 90 |
| 20,1 | 97 | 3 |
| 27,0 | 97 | 3 |

A tömegspektrometriás paraméterek az **5. táblázatban** kerültek összefoglalásra.

5. táblázat – Az LNB és LacNAc detektálásához használt tömegspektrometriás módszer paramétere.

| | |
|--|----------|
| Porlasztógáz hőmérséklete | 350 °C |
| Porlasztógáz nyomása | 40 psi |
| Porlasztógáz áramlási sebessége | 9 l/perc |
| Kapilláris feszültség | 4000 V |
| Fragmentor feszültség | 210 V |
| Ütközési energia | 28 V |

Ütköztető gázként nitrogén gázt alkalmaztunk. A tömegspektrumokat pozitív ionizációs módban vettük fel. A mennyiségi meghatározás előtt a fragmentor feszültség és az ütközési energia értékeket az Agilent Masshunter Optimizer szoftver segítségével állapítottuk meg. A m/z 408 prekursor ion – ami nem más, mint a redukált cukrok nátrium adduktja, $[M+Na]^+$ – fragmentációja 2 fő fragmenst eredményezett. A 210 V fragmentor feszültség és 28 V ütközési energiával nyert m/z 246 fragmenst választottuk a mennyiségi meghatározáshoz, amíg a 210 V fragmentor feszültség és 28 V ütközési energiával nyert m/z 228 fragmens a kvalifikálás céljából került kiválasztásra, mind az LNB, mind a LacNAc esetében. Az LNB-re vagy a LacNAc-ra szelektív fragmenst sem a fent megjelölt paraméterek, sem más fragmentor feszültségek és ütközési energiák mellett nem tapasztaltunk. A mennyiségi meghatározást többszörös reakciókövetéssel (MRM) végeztük. A mérésekhez, valamint azok kiértékeléséhez Masshunter B.01 03 szoftvert használtunk.

5.1.6. Mintaelőkészítés

5.1.6.1. Zsírok és fehérjék eltávolítása a mintákból

A törzsoldatok előzetesen redukált LNB és LacNAc standardok pontos bemérésével és vízben való oldásával készültek, koncentrációjuk 60 $\mu\text{g/ml}$ volt. A validáláshoz használt oldatok a törzsoldat vízzel való megfelelő hígításával készültek.

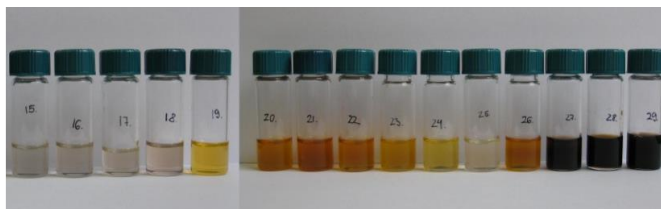
Az anyatej zsír- és fehérjementesítéséhez a Ninonuevo és mtsai által használt módszert adaptáltuk kisebb módosításokkal [15]. Az anyatej mintákat (10 ml) 4 térfogategység (40 ml) 2:1, V/V kloroform:metanol keverékkel extraháltuk. A keveréket 5-10 percen keresztül rázattuk vortex segítségével, majd az így kapott emulziót 30 percen keresztül 3139 \times g (6000 rpm) mellett egy SIGMA Sartorius 2-16P centrifugával centrifugáltuk. A felső, vizes-metanolos fázist összegyűjtöttük, majd az alsó kloroformos fázist és a kicsapott fehérjéket elöntöttük. A teljes folyamatot megismételtük a mintaelőkészítés megfelelő hatékonysága érdekében. A második folyadék-folyadék extrakció és centrifugálás során összegyűjtött vizes-metanolos fázist N_2 gáz alatt pároltuk be a szerves oldószer eltávolításáig, majd a mintát liofilizáltuk egy SCANVAC CoolSafe liofilizátorral.

5.1.6.2. *LNB/LacNAc tartalmú frakciók izolálása*

A liofilizált mintákat 500 µl desztillált vízben oldottuk fel, majd méretkizárásos oszlopkromatográfiának vetettük alá, hogy a nagy mennyiségben jelenlévő laktóztól elválasszuk az anyatejben megtalálható többi szacharidot, valamint, hogy ezen szacharidokat méretük alapján frakcionáljuk. A méretkizárásos oszlop (hossz: 170 cm, belső átmérő: 2 cm) állófázisa egy BioRad Bio Gel P2 töltet volt. Eluensként 0,2 g/l töménységű nátrium-azidos desztillált vizet használtunk. Összesen 225 frakciót gyűjtöttünk az elválasztás során, egyenként 1,8 ml-es térfogattal.

5.1.6.3. *LNB/LacNAc detektálása a frakciókban*

A frakciók előzetes vizsgálatát egy fenol – H₂SO₄ színreakcióval végeztük el (**8. ábra**) [142]. Minden egyes frakció 100 µl-éhez 25 µl 80%-os fenol oldatot és 250 µl tömény H₂SO₄-at adtunk. A szacharidtartalmú frakciók a színreakció eredményeként 10 perc alatt sárgás-barnás színűvé váltak (a színintenzitás arányos a szacharidok koncentrációjával). A pozitív színreakciókat adó frakciókat egy tömegspektrometriás vizsgálatnak vetettük alá, hogy meghatározzuk az LNB/LacNAc-tartalmú frakciókat. A méréseket egy Agilent 6230 repülési idő analizátoros elektroporlasztásos ionizációs készüléken végeztük. Az LNB/LacNAc-tartalmú frakciókat összeöntöttük, majd liofilizáltuk.



8. ábra - Az aspecifikus fenol – H₂SO₄ reakció eredményeként a szacharidtartalmú frakciók a cukorkoncentrációtól függően barnás-narancssárgára színeződnek, a képződött színes termék abszorpciós maximuma 496 nm.

5.1.6.4. *LNB/LacNAc redukálása*

Az LNB/LacNAc alditol formává való redukációjához 1,0 M NaBH₄-oldatot használtunk. A redukcióhoz az előzetesen liofilizált mintákat 200 µl desztillált vízben oldottuk, majd a 200 µl 1,0 M NaBH₄-oldat hozzáadása után 90 percig 65 °C-os vízfürdőben inkubáltuk [105]. A redukció lezajlását követően a sót szilárdfázisú extrakcióval távolítottuk el, amihez egy nem-pórusos grafitizált szén töltetű oszlopot használtunk. A minták felvitele előtt a töltetet 6 ml metanollal és 6 ml desztillált vízzel kondicionáltuk. A redukált mintákat 1 ml desztillált vízben oldottuk fel, majd felvittük a töltetre. A mosási protokollt Arias és mtsai-tól vettük át kisebb módosításokkal: 7 x 2 ml 2-3 °C-os desztillált vízzel mostuk le a töltetről a borát sót. A redukált LNB/LacNAc elúcióját 3 x 1 ml szobahőmérsékletű 1:1 térfogatarányú ACN:H₂O

keverékkel végeztük [143]. Az így kapott 3 ml-es mintákat liofilizáltuk, majd a korábban leírt (5.1.5 fejezet) HPLC-MS módszerrel analizáltuk.

5.1.7. Módszervalidálás

A módszervalidálást az Európai Gyógyszerügynökség (EMA) irányelvei alapján végeztük [144], meghatároztuk a módszer specifikusságát, szelektivitását, pontosságát, linearitását, kimutatási határát, mennyiségi jellemzési határát, torzítatlanságát és az alkalmazott oldatok stabilitását.

A módszer pontosságát az LNB és a LacNAc retenciós idejének és csúcs alatti területeinek relatív standard deviációjával (RSD%) határoztuk meg. A három párhuzamos mérés során 4 különböző, de állandó koncentrációsintet vizsgáltunk (0,03 µg/ml, 0,06 µg/ml, 0,3 µg/ml, 0,9 µg/ml).

A linearitást 0,03–0,9 µg/ml koncentráció tartományban vizsgáltuk. A kalibrációs egyenesek hat pontból álltak, minden koncentrációnál három injektálást végeztünk. A regressziós egyeneshez a legkisebb négyzetek módszerét használtuk. Annak érdekében, hogy igazoljuk, hogy a kalibráció megbízható eredményekkel szolgál, egy reprezentatív mintán standard addíciót végeztünk. Ehhez felvettük az LNB és a LacNAc kalibrációs egyenesét úgy, hogy a laktáció negyedik napjáról származó anyatej minta részleteihez LNB és LacNAc standardokat adtunk az alábbi végső koncentrációk eléréséig:

LNB: 0 µg/ml (standard addíció nélkül); 12,2 µg/ml; 24,4 µg/ml; 36,6 µg/ml; 48,8 µg/ml

LacNAc: 0 µg/ml (standard addíció nélkül); 134,6 µg/ml; 269,2 µg/ml; 403,8 µg/ml; 538,5 µg/ml

A kapott kalibrációs egyenesek alapján számoltuk az anyatej LNB- és LacNAc-tartalmát.

Az LOD értéket az alapvonal zaj háromszorosának megfelelő jelként határoztuk meg, amíg az LOQ értéket az alapvonal zaj tízszeresét adó értéként számoltuk.

A módszer torzítatlanságának meghatározásához a kalibrációs pontok koncentrációjának a névleges koncentrációtól való eltérését számoltuk az alábbi képlet szerint: $[(c_m - c_n)/c_n] \cdot 100$, ahol a c_m a mért, a c_n pedig a névleges koncentrációt jelöli. A visszanyerhetőséget négy különböző koncentrációértéknél vizsgáltuk (0,03 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,6 µg/ml és 0,9 µg/ml) mindkét anyag esetén. A mátrixhatás figyelembevétele érdekében oldószerként anyatej mintát használtunk és a minták standardoldattal való spike-olása mellett (végső koncentráció: 0,03

$\mu\text{g/ml}$, 0,2 $\mu\text{g/ml}$, 0,6 $\mu\text{g/ml}$ és 0,9 $\mu\text{g/ml}$) vak oldatnak nem spike-olt anyatej mintákat is készítettünk. Az átlagos visszanyerési százalékot mindkét anyag esetében meghatároztuk.

A törzsoldatokat a validáció három napos időtartama alatt mindvégig hűtőben tároltuk 2-8 °C között. Az oldat stabilitásának meghatározásához az oldat tisztaságát vizuálisan ellenőriztük, emellett pedig a frissen készített és a három napig állt minták kromatogramjait összehasonlítottuk mind a standard oldatok, mind az anyatej minták esetében.

5.2. Gázkromatográfiás oligoszacharid analízis

5.2.1. Standardok és reagensek

A 2'-FL és 3-FL standardokat a Glycom A/S (Kongens Lyngby, Denmark) cég biztosította számunkra. Az anyatej minták egészséges önkéntesektől származtak a szülést követő időszakból. Minden mintát steril mintatartóba gyűjtöttük és felhasználásig -40 °C-on tároltuk.

Az analitikai reagens minőségű metanolt és kloroformot a Sigma-Aldrich GmbH-től (Seelze, Germany) vásároltuk. Az analitikai reagens minőségű piridint, hidroxilamin-hidrokloridot, hexametildiszilazánt (HMDS) és trifluoecetsavat (TFA) egyaránt Dr. Perlné Molnár Ibolya professzor asszony bocsátotta rendelkezésünkre. Az LC-minőségű vizet Millipore Direct Q5 víztisztító rendszerrel (Bedford, MA, USA) készítettük.

5.2.2. Mintaelőkészítés

Minden anyatej mintából 5 ml-t zsírtalanítottunk és fehérjementesítettünk 20 ml kloroform:metanol (2:1, V/V) keverékkel, 5 perces rázatással vortex segítségével. A mintákat ezután 30 percig 3139×g (6000 rpm) mellett egy SIGMA Sartorius 2-16P centrifugával centrifugáltuk. Az alsó kloroformos fázist és a kicsapott fehérjéket elöntöttük, majd a kirázást megismételtük a hatékonyság növelése érdekében. A származékképzést a második extrakciós lépésből származó vizes fázissal végeztük.

50-100 μl tisztított anyatej mintát vagy vizes standard oldatot szárazra pároltunk egy Martin Christ RVC 2-25 centrifugális bepárlóban (Osterode am Harz, Németország) 30 °C-on, vákuum alatt. Az így kapott mintákat 125 μl 2,5 g/100 ml hidroxilamint tartalmazó piridinben oldottuk, majd 30 percig 70 °C-on melegítettük. A lehűlt mintákat 225 μl HMDS és 25 μl TFA segítségével trimetilszilileztük 60 percig 100 °C-on. A lehűlt keveréket egy 0,2 μm RC membrán fecskendőszűrőn (Phenomenex, Torrance, CA, USA) átszűrtük. A szűrletet mintatartókba gyűjtöttük, lezártuk, majd GC-MS analízisnek vetettük alá.

5.2.3. GC-MS paraméterek bemutatása

A méréseket egy CTC Combi PAL (CTC Analytics AG, Zwingen, Svájc) automata többfunkciós mintaadagoló rendszerrel felszerelt Agilent 6890N/5973 GC-MSD (Santa Clara, CA, USA) készülékkel végeztük. Az elválasztáshoz egy Supelco (Bellefonte, PA, USA) SLB-5ms kapilláris kolonnát (30 m x 250 µm belső átmérő, 0,25 µm filmvastagság) használtunk. A GC kromatográfiás kemence hőmérséklete 200 °C-ról (2 perc izotermális szakaszt követően) 325 °C-ra emelkedett 4 °C/perc sebességgel, majd 7,25 percig tartotta a 325 °C-os hőmérsékletet. Vivőgázként héliumot használtunk 1,0 ml/perc állandó áramlás mellett. A forró tús injektáláshoz 3 és 2 másodperces elő- és utóinjektálási késleltetési időt alkalmaztunk. Az injektálási térfogat 1,0 µl volt, ami további 1,0 µl légbuborékkal lett kiegészítve a mintavételezést követően az injekciós fecskendő injektálás előtti kiürítése végett. Az injektor hőmérséklete 200 °C-ról 320 °C-ra nőtt 720 °C/perc sebességgel, emellett egy 1,7 percig tartó 40 psi nyomást is alkalmaztunk, miközben a splitless időt 1,5 percre állítottuk.

A kvadrupól tömeganalizátorral felszerelt tömegszelektív detektort elektron ionizációs módban üzemeltettük 70 eV mellett. Az azonosításhoz a teljes tömegtartományt felvettük m/z 40-800 között 2 scan/másodperc frekvenciával. A 2'-FL és 3-FL abszolút kvantifikálásához szelektív ion követést alkalmaztunk, amelyhez mindkét molekula esetében az m/z 204 és 361 fragmenseket követtük. A mérésekhez és az adatok kiértékeléséhez az MSD ChemStation (D.02.00.275) szoftvert alkalmaztuk.

5.2.4. Módszervalidálás

A 2'-FL és 3-FL mennyiségi meghatározása külső standard kalibrációs módszerrel történt. A törzsoldatokat 2'-FL és 3-FL pontos bemérésével és vízben való oldásával végeztük úgy, hogy a kapott oldatok koncentrációja 2'-FL-ra nézve 1 mg/ml, 3-FL-ra nézve pedig 100 µg/ml legyen. A validáláshoz használt oldatokat a törzsoldatok vízzel való hígításával, majd 250 µl-es egységek vákuum alatt történő bepárlásával és az 5.2.2 fejezetben már ismertetett származékképzéssel nyertük. A kalibrációs tartomány 2'-FL-ra nézve 21-667 µg/ml, 3-FL-ra nézve pedig 4-67 µg/ml volt. Minden kalibrációs oldatot háromszor injektáltuk, a kalibrációs egyenesek 6 kalibrációs pontból álltak. A regressziós egyenest súlyozás nélküli kvadratikus illesztéssel vettük fel. A legalsó kvantifikálási limitet (LLOQ) azon legkisebb koncentrációjú kalibrációs pontként definiáltuk, ahol a pontosság és torzítatlanság a hatósági irányelvek szerint 20% alatti volt [144, 145].

A pontosságot a két triszacharid mért koncentrációinak relatív szórásaként (RSD%) fejeztük ki. A torzítatlanságot a relatív hiba számításával határoztuk meg az alábbi képlet

alapján: $[(c_m - c_n)/c_n] \times 100$, ahol a c_m és a c_n a kalibrációs oldatok mért és névleges koncentrációit jelölik.

A triszacharidok visszanyerhetőségét 1 ml anyatej minta 100 μ l standard oldattal történő spike-olásával végeztük 3-3 párhuzamos minta esetén úgy, hogy a standardok végleges koncentrációja a mintában 2'-FL-ra nézve 1, 2 és 8 mg/ml, 3-FL-ra nézve pedig 0,1, 0,2 és 0,8 mg/ml lett. Vak mintákat is készítettük 1 ml anyatej minta 100 μ l desztillált vízzel történő spike-olásával.

A minták származékképzést követő stabilitását 4 napon keresztül vizsgáltuk szobahőmérsékleten (25 °C). Az oldatok tisztaságát vizuálisan, a stabilitást a frissen készített oldatok, valamint a tárolt oldatok kromatogramjainak összehasonlításával is vizsgáltuk.

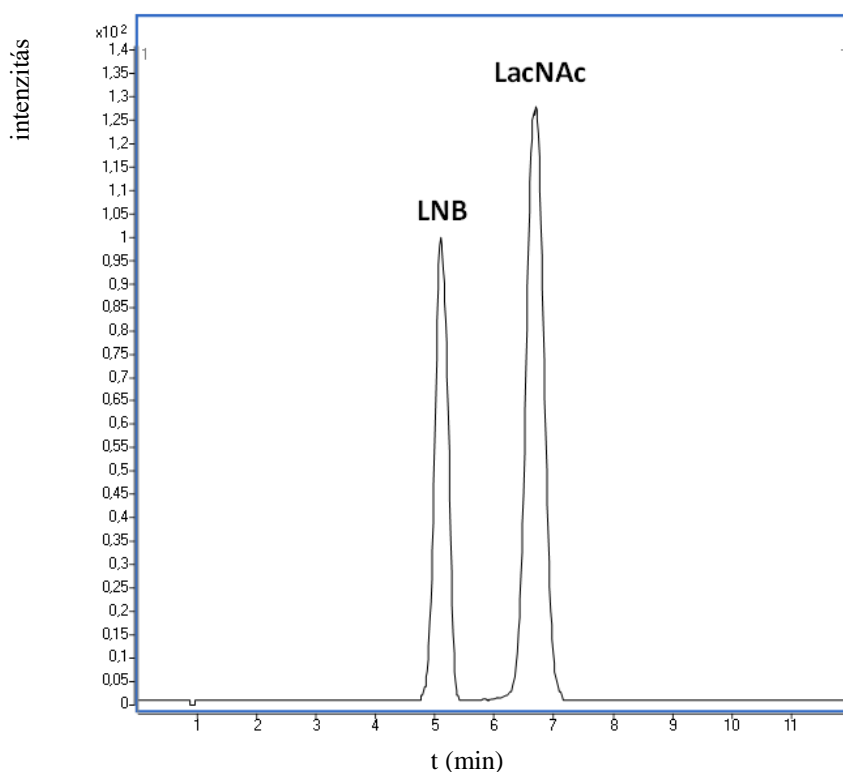
6. Eredmények

6.1. Lakto-*N*-bióz és *N*-acetillaktózin vizsgálata

6.1.1. PGC alapú elválasztás

A HILIC módszert, valamint a fordított fázisú kromatográfias módszert a felmerült problémák miatt már a módszerfejlesztés során elvetettük, így ezeket, mint ahogyan a porózus grafit állófázissal történő korai módszerfejlesztési eredményeket is a Megbeszélés fejezetben ismertetem.

Az elválasztáshoz használt Hypercarb (5 μ m; 100 x 2,1 mm) oszlopon izokratikus elúcióval 3% metanol és 97% 0,1% V/V HCOOH eluensek mellett a regioizomerek alapvonalú elválását tapasztaltuk (9. ábra).



9. ábra – A standard anyagoknak a kifejlesztett kromatográfias módszerrel (A eluens: 0,1% V/V HCOOH vizes oldata; B eluens: metanol; 0,5 ml/perc áramlási sebesség), MRM módban detektált kromatogramja.

A HCOOH hozzáadása a vizes fázishoz élesebb csúcsokat eredményezett és növelte a tömegspektrométerben az ionizáció hatékonyságát. A módszerfejlesztés során tapasztalt retenciós idő stabilitási problémát a kidolgozott mosási protokoll (5.1.5 fejezet) – amely során nagy mennyiségű szerves eluenssel (90% metanol) történt az állófázis regenerálása – megszüntette. A mosási protokoll alkalmazása mellett a retenciós idő stabilitási probléma a későbbiekben már nem jelentkezett.

Az Agilent MassHunter Optimizer szoftver segítségével a kvalifikáláshoz és a mennyiségi meghatározáshoz az m/z 228 és m/z 246 fragmenseket választottuk ki mindkét molekula esetében. Szelektív fragmenst egyik molekula esetében sem tudtunk azonosítani.

6. táblázat - Az LNB és LacNAc módszervalidálási eredményei: pontosság, linearitás, torzítatlanság, LOD és LOQ.

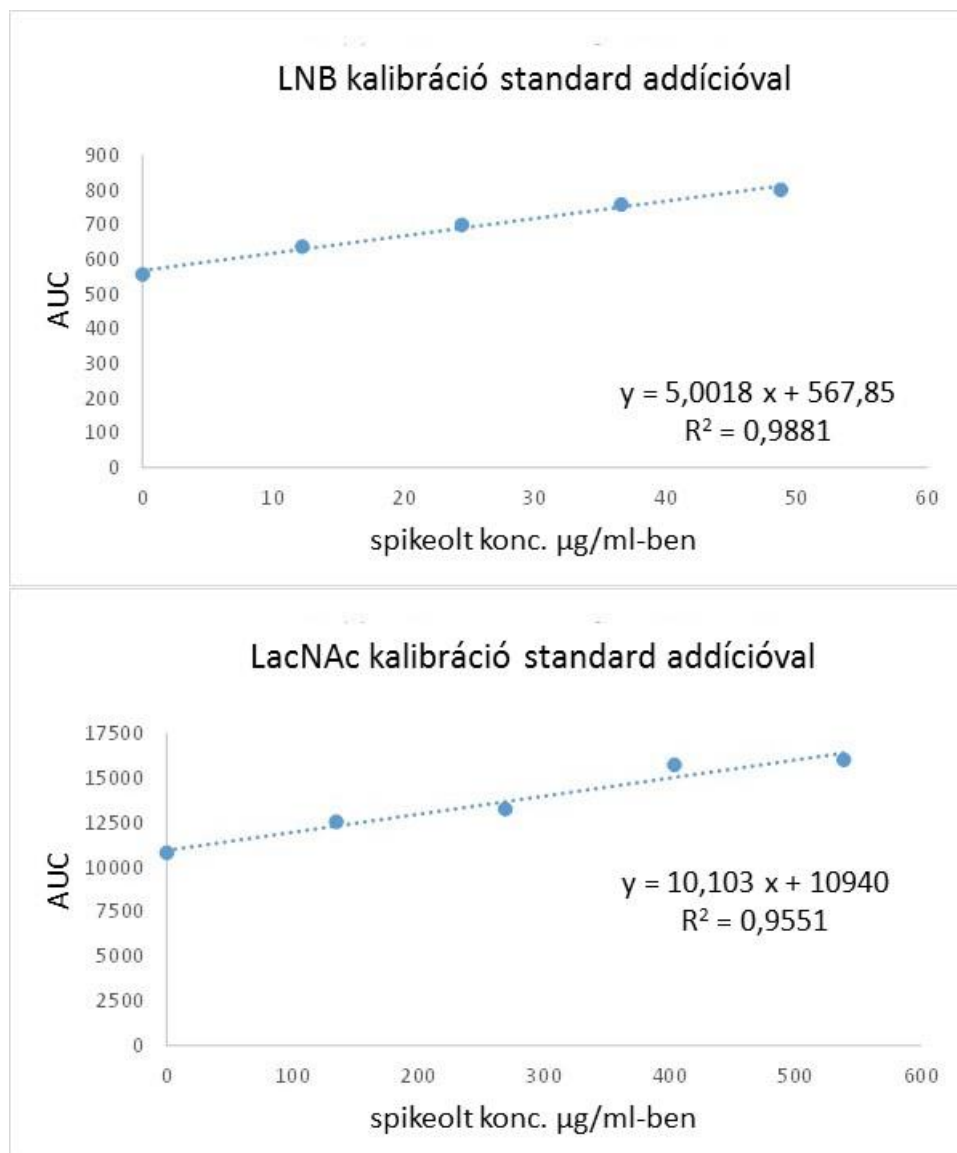
| Lakto-N-bióz | | | | N-acetillaktózin | | | | |
|-----------------------------|----------------|----------------|---------------|----------------------------|-----------------------|----------------|----------------|---------------|
| Pontosság (RSD%) (n=3) | | | | | | | | |
| Csúcs alatti terület | | | | | Csúcs alatti terület | | | |
| 0,03 µg/ml | 0,06 µg/ml | 0,3 µg/ml | 0,9 µg/ml | | 0,03 µg/ml | 0,06 µg/ml | 0,3 µg/ml | 0,9 µg/ml |
| 2,59 | 1,42 | 0,86 | 0,27 | 1. nap | 1,83 | 0,92 | 0,90 | 0,26 |
| 0,59 | 1,01 | 0,34 | 0,47 | 2. nap | 1,36 | 1,65 | 0,41 | 0,50 |
| 1,87 | 1,24 | 0,62 | 0,35 | Napok közötti (n=6) | 1,46 | 1,53 | 0,69 | 0,36 |
| Retenciós idő | | | | | Retenciós idő | | | |
| 0,03 µg/ml | 0,06 µg/ml | 0,3 µg/ml | 0,9 µg/ml | | 0,03 µg/ml | 0,06 µg/ml | 0,3 µg/ml | 0,9 µg/ml |
| 0,95 | 0,58 | 0,63 | 0,61 | | 0,54 | 0,49 | 0,62 | 0,62 |
| Linearitás | | | | | | | | |
| Regressziós egyenes | | R ² | | | Regressziós egyenes | | R ² | |
| y = 182,81 x - 1,0673 | | 0,9992 | | | y = 313,47 x - 3,5669 | | 0,9994 | |
| Torzítatlanság (%) (n=3) | | | | | | | | |
| 0,03 µg/ml | 0,06 µg/ml | 0,3 µg/ml | 0,9 µg/ml | | 0,03 µg/ml | 0,06 µg/ml | 0,3 µg/ml | 0,9 µg/ml |
| -11,9 | -4,6 | 2,7 | -1,2 | | -12,9 | -3,5 | 1,8 | -1,1 |
| Visszanyerhetőség (%) (n=3) | | | | | | | | |
| 0,03 µg/ml | 0,06 µg/ml | 0,3 µg/ml | 0,9 µg/ml | | 0,03 µg/ml | 0,06 µg/ml | 0,3 µg/ml | 0,9 µg/ml |
| 101,6 ± 8,0 | 102,7 ± 0,3 | 98,7 ± 1,3 | 99,9 ± 0,2 | | 104,5 ± 2,4 | 105,2 ± 1,7 | 102,9 ± 0,4 | 98,2 ± 0,5 |
| LOD/LOQ (µg/ml) | | | | | | | | |
| LOD | | LOQ | | | LOD | | LOQ | |
| 0,008 | | 0,027 | | | 0,007 | | 0,023 | |

6.1.2. Módszervalidálás

A szelektivitás vizsgálata során egy vak oldatnak, a standardkeverék oldatának és egy anyatej mintának a kromatogramja került összehasonlításra. A vak oldat esetében nem jelent meg semmilyen, a vizsgált molekulákkal interferáló, zavaró kromatográfiás csúcs. A standard modelloldat kromatogramját és az anyatej minta kromatogramját a mátrixhatás kizárása céljából szintén összehasonlítottuk és ismételten nem találtunk interferáló csúcsot.

A validálási eredmények a **6. táblázat**ban kerültek feltüntetésre. A kifejlesztett módszer pontossága megfelelőnek bizonyult, mivel a csúcs alatti területekre számolt RSD érték 5%

alatti, a retenciós időkre számolt RSD érték pedig 1% alatti mindkét anyagra az összes vizsgált koncentrációnál. A számolt regressziós egyenes jó linearitást mutatott, a determinációs koefficiens (R^2) mindkét anyag esetében 0,9992-nél nagyobb volt. A reprezentatív minta standard addíciós vizsgálata során igazoltuk, hogy a mátrix nem befolyásolja a módszer pontosságát. A standard addíciós módszerrel felvett kalibrációs egyenesekből (10. ábra) az LNB- és LacNac-tartalom 1 ml anyatejre megadva a laktáció negyedik napján (figyelembe véve a hígítási faktort és a regressziós egyenes tengelymetszetének standard deviációját): $0,0572 \pm 0,0022$ mg és $0,0052 \pm 0,0001$ mg volt. Ezek az eredmények jól korreláltak a standard addíció nélkül felvett kalibrációs egyenesekből számolt eredményekkel.



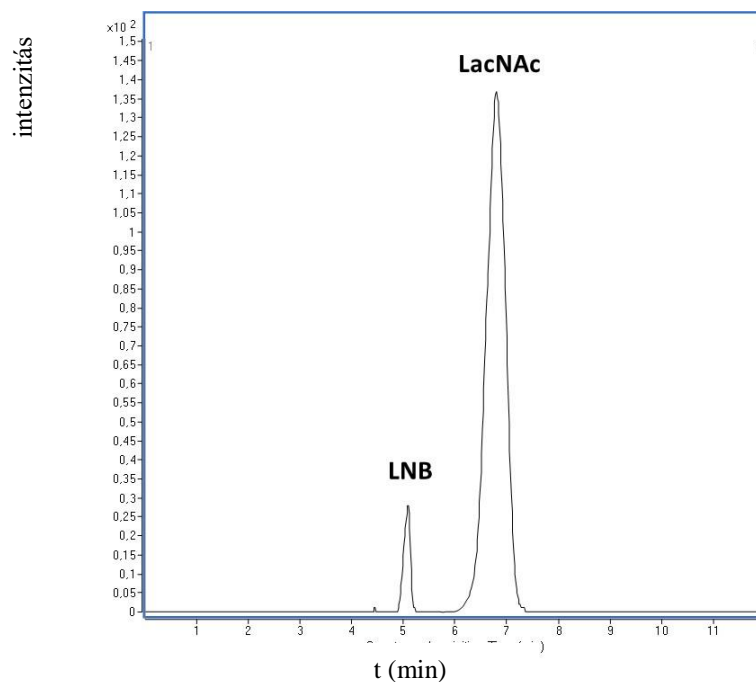
10. ábra – Az LNB (a) és a LacNac (b) standard addícióval felvett kalibrációs egyenesei.

Az LNB esetében az LOD érték $0,008 \mu\text{g/ml}$, az LOQ érték pedig $0,027 \mu\text{g/ml}$ volt, a LacNac esetében az LOD érték $0,007 \mu\text{g/ml}$ -nek, az LOQ érték pedig $0,023 \mu\text{g/ml}$ -nek adódott.

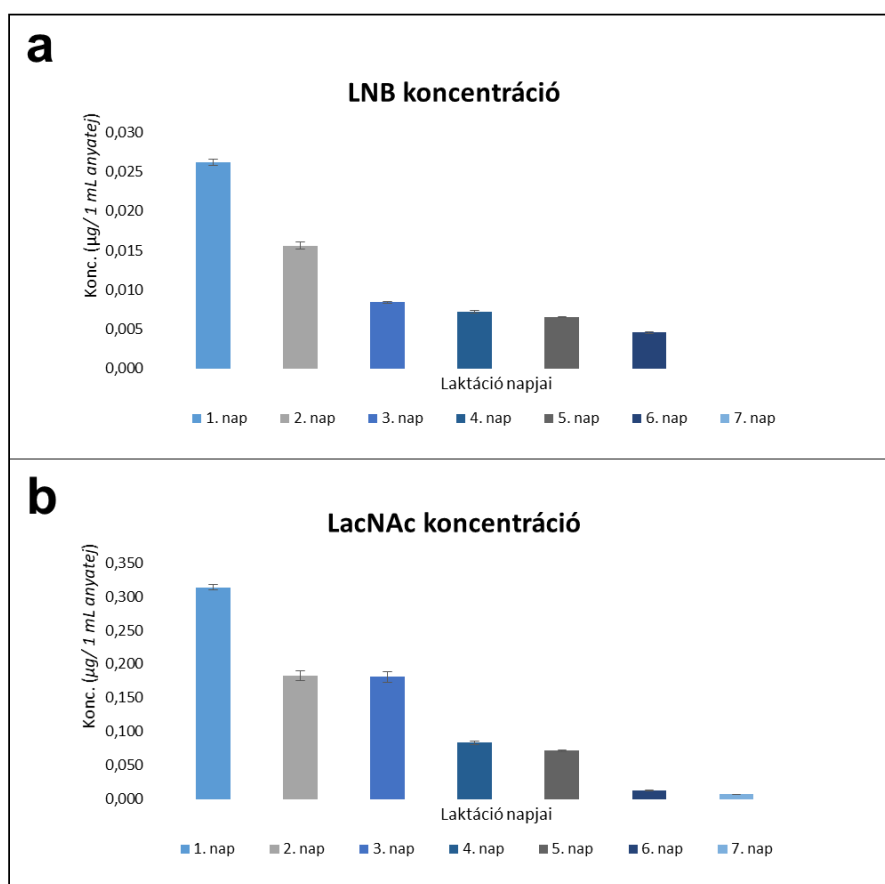
A módszer torzítatlanságának meghatározásához mért adatok az EMA irányelvek szerinti határértéken (LOQ esetében $\pm 15\%$ vagy $\pm 20\%$) belüliek voltak [144]. A visszanyerhetőség mindkét anyag esetében minden koncentráción 98,2–105,2% közöttinek adódott. A csúcs alatti területek minden esetben korrigálásra kerültek a vak oldatban mért csúcs alatti területekkel, figyelembe véve az anyatej természetes LNB- és LacNac-tartalmát, ami miatt ezen korrekció nélkül a visszanyerhetőségi adatok valótlan eredményt mutatnának. A standardoldatok és az anyatej minták a vizuális értékelés, valamint a friss és három napig állt minták kromatogramjainak összehasonlítása alapján is stabilnak minősültek az adott körülmények között.

6.1.3. Anyatej minták vizsgálata

Egy egészséges önkéntes anyatej mintáját vizsgáltuk a kidolgozott módszerrel a laktáció első hetében. Az eredmények azt mutatták, hogy az LNB és a LacNac is megtalálható az anyatejben (**11. ábra**), mennyiségük folyamatosan csökken: a LacNac koncentrációja 310 $\mu\text{g/ml}$ -ről 6,7 $\mu\text{g/ml}$ -re csökkent, az LNB koncentrációja pedig 26 $\mu\text{g/ml}$ -ről az LOD értéke alá csökkent a laktáció első hetében (**12. ábra**). A végső koncentrációk a hígításokat figyelembe véve és 1 ml nyers (feldolgozatlan) anyatejre vonatkoznak.



11. ábra - A laktáció első napjáról származó anyatej minta kromatogramja MRM módban detektálva: az LNB és LacNac közötti szignifikáns koncentrációkülönbség szemléltetésére.



12. ábra - Az LNB (a) és a LacNAc (b) koncentrációváltozása anyatej mintákban a laktáció első hetében. A koncentrációk 1 ml anyatejre vonatkoznak, figyelembe véve a hígítási faktorokat és a visszanyerhetőséget.

6.2. Gázkromatográfias oligoszacharid analízis

6.2.1. Standard anyagok vizsgálata

A 2'-FL és 3-FL standardok fragmentációs mintázatát vizsgálva meghatároztunk mindkét anyagra jellemző fragmenseket, úgymint a m/z 73, m/z 90, m/z 363, m/z 273, m/z 204 és a m/z 217. A szerkezetek nagyfokú hasonlósága ellenére az egyes molekulákra szelektív fragmenseket is tudtunk azonosítani, amelyek nagyban segítették az azonosításukat. A 2'-FL-ra jellemző szelektív fragmens a m/z 538, amíg a 3-FL jellemző szelektív fragmensek a m/z 451 és m/z 361.

A szelektív fragmensek ellenére az azonosításhoz szükséges volt kromatográfiasan az anyagok alapvonal elválasztását is elérnünk, amit sikeresen megvalósítottunk a kidolgozott módszerrel. A módszer nem csupán a kapcsolódási izomer 2'-FL és 3-FL egymástól való alapvonal elválasztására volt alkalmas, hanem a több nagyságrenddel nagyobb mennyiségben jelenlévő laktóztól való elválasztásukra is.

6.2.2. Módszervalidálás

A kidolgozott GC-MS módszer alkalmasnak bizonyult a vizsgált anyagok és a biológiai mátrix egyéb alkotóelemeinek alapvonal elválásztására. A mátrixhatás vizsgálata érdekében anyatej minták és standard anyagok kromatogramjait és teljes tömegspektrumát hasonlítottuk össze, ami alapján zavaró csúcsot nem találtunk.

7. táblázat – A 2'-FL és 3-FL mennyiségi meghatározására kidolgozott módszer pontossága és torzítatlansága.

| Koncentráció | | 2'-FL | | 3-FL | |
|--------------|------|-----------|----------------|-----------|----------------|
| (µg/ml) | | Pontosság | Torzítatlanság | Pontosság | Torzítatlanság |
| 2'-FL | 3-FL | (RSD%) | (%) | (RSD%) | (%) |
| 42 | 2 | 0,3 | 6,0 | 1,3 | -3,7 |
| 167 | 17 | 2,4 | 3,1 | 3,2 | 9,8 |
| 333 | 33 | 0,7 | -1,3 | 4,8 | -3,4 |

A kvadratikus illesztéssel kapott regressziós egyenesek jó illeszkedést mutattak, mindkét anyag esetében 0,99-nél nagyobb determinációs koefficienssel (R^2). A kalibrációs pontok koncentrációjának eltérése a névleges koncentrációtól minden esetben a hatóságilag előírt értéken (LLOQ-ra $\pm 15\%$ vagy $\pm 20\%$) belüliek voltak [144]. A GC-MS módszer pontos és torzítatlan, mivel a RSD% és a relatív hiba a 2'-FL esetében 2,4 és 6,0%, a 3-FL esetében pedig 4,8 és 9,8% alatt, jóval a 15%-os elfogadási határ alatt voltak (7. táblázat).

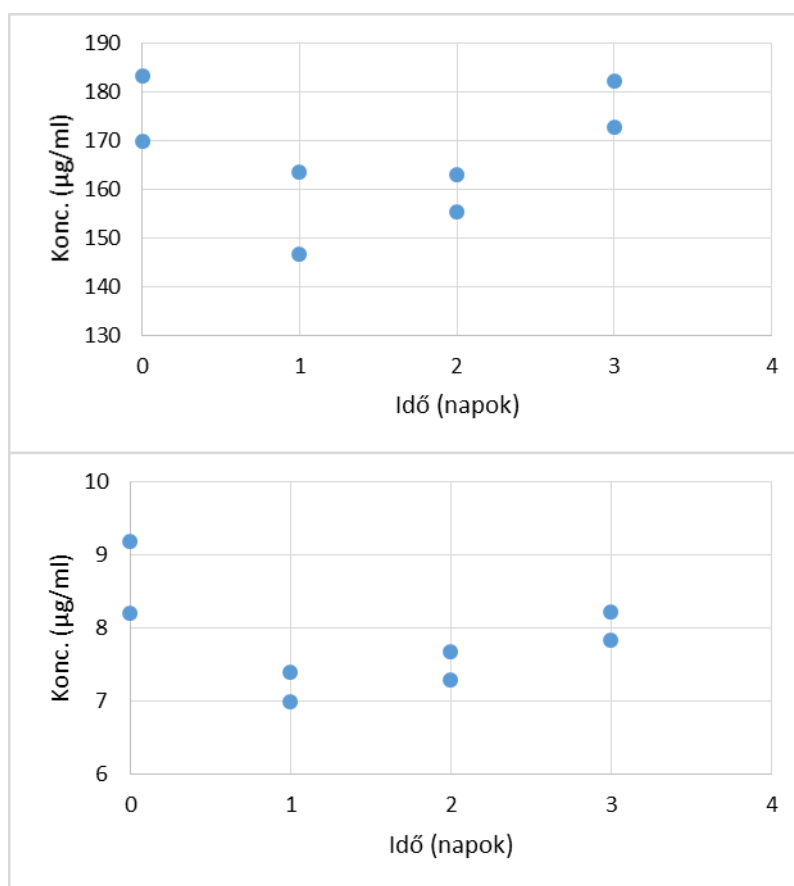
Az LLOQ értéke a 2'-FL esetében 21 µg/ml-nek, a 3-FL esetében 4 µg/ml-nek adódott. A visszanyerhetőségre 22 és 29% közötti értékeket kaptunk (8. táblázat). Az átlagos visszanyerhetőség 2'-FL-ra $26 \pm 4\%$, 3-FL-ra $25 \pm 3\%$ volt. A mérési eredmények minden esetben korrigálásra kerültek ezekkel az értékekkel.

8. táblázat – Az anyatej mintákhoz adott triszacharidok visszanyerhetősége.

| Spike-olás szintje ^a | 2'-FL (%) | 3-FL (%) |
|---------------------------------|------------|------------|
| 1 | 22 ± 1 | 22 ± 2 |
| 2 | 29 ± 5 | 27 ± 6 |
| 3 | 27 ± 1 | 24 ± 1 |
| Átlagos visszanyerhetőség | 26 ± 4 | 25 ± 3 |

^aA 2'-FL esetében az 1, 2 és 3 spike-olási szintek az alábbiak: 1 mg/ml, 2 mg/ml és 8 mg/ml; a 3-FL esetében ezek az értékek az alábbiak voltak: 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml és 0,8 mg/ml.

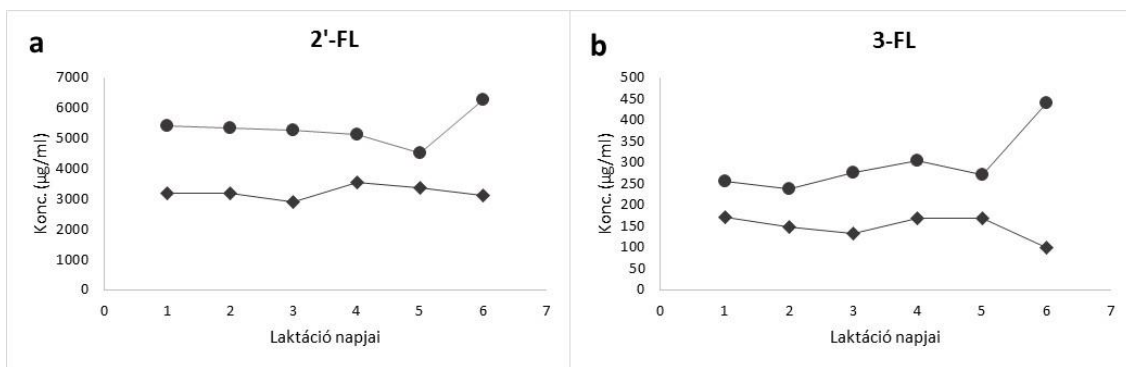
A minták stabilitását a 4 napos vizsgálati időtartamra elvégeztük: nem tapasztaltunk szignifikáns változást sem vizuálisan, sem pedig a 2'-FL és a 3-FL koncentrációjában a frissen készített és a négy napon keresztül állt minták kromatogramjának összehasonlítása alapján (13. ábra).



13. ábra – A származékolt 2'-*O*-fukozillaktóz és 3-*O*-fukozillaktóz stabilitása derivatizált anyatej minták esetében a validálás időtartama (3 nap) alatt.

6.2.3. Anyatej minták vizsgálata

A két egészséges önkéntestől (*A donor* és *B donor*) kapott, a laktáció első hetéből származó minták esetén kimutattuk és mennyiségileg meghatároztuk a 2'-FL és a 3-FL mennyiségét. *A donor* esetében a 2'-FL mennyisége 4525 és 6266 µg/ml között, a 3-FL mennyisége pedig 271 és 441 µg/ml között változott. *B donor* esetében ezek az értékek 2694 és 3551 µg/ml közöttiek voltak a 2'-FL-ra nézve és 99 és 208 µg/ml közöttiek a 3-FL-ra nézve. A koncentrációk minden esetben 1 ml nyers (feldolgozatlan) anyatejre vonatkoznak, figyelembe véve a visszanyerhetőséget és a hígításokat. A koncentrációk változásában tendencia nem volt megfigyelhető. A *B donor* esetében rendelkezésünkre álltak anyatej minták a szülést követő első és második hónapból is, amelyek vizsgálata során a 2'-FL mennyisége 3070 és 2698 µg/ml volt, a 3-FL mennyisége pedig 154 és 204 µg/ml-nek adódott (**14. ábra**).



14. ábra – A 2'-*O*-fukozillaktóz (a) és 3-*O*-fukozillaktóz (b) koncentrációjának változása a laktáció első hetében. A fekete pontok az A donor, a fekete négyzetek pedig a B donor esetén mért értékeket mutatják.

7. Megbeszélés

7.1. Lakto-*N*-bióz és *N*-acetillaktózamin vizsgálata

A módszerfejlesztés során három különböző állófázis (HILIC, Fordított fázis, Porózus grafit állófázis) alkalmasságát vizsgáltuk a kapcsolódási izomer diszacharidok elválasztására. Ezen állófázisok mindegyike ígéretesnek mutatkozott irodalmi adatok alapján, azonban a gyakorlatban számos problémába ütköztünk [102, 112, 125-127, 130].

7.1.1. HILIC

A HILIC mozaikszó a **h**ydrophilic **i**nteraction **l**iquid **c**hromatography, vagyis hidrofil interakción alapuló folyadékkromatográfia rövidítése. Ez a folyadékkromatográfia egy olyan új ága, amely az elválasztási technikák között egy igen jelentős hiányt tölt be, alapvetően a nagy polaritású és ionos anyagok elválasztási módszere, amely a korábban ismert folyadékkromatográfias rendszerekben nehezen, vagy egyáltalán nem volt kivitelezhető. Emellett nagy előnye, hogy amíg az ionos vegyületek elválasztására szintén alkalmazható ionpár kromatográfiában az alkalmazott ionpároképző só formájában van jelen, ezért tömegspektrometriával (MS) és elpárologtatás utáni fényszórásméréssel alapuló detektorral (ELSD) sem mindig kapcsolható, addig a HILIC esetében mindkét nagyérzékenységű detektálási mód alkalmazható.

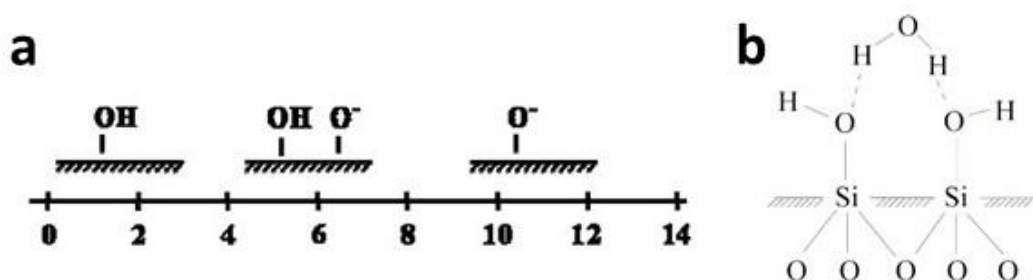
Az elválasztás mechanizmusa összetett, általában ennél a módszernél több, egymás mellett lejátszódó folyamat együttesen befolyásolja az elválasztást, ami a módszerfejlesztésnél előnyösen kihasználható. A polaritásviszonyokat tekintve mind az álló-, mind a mozgófázis poláris tulajdonságú, azonban a mozgófázis polaritása minden esetben kisebb, mint az állófázis polaritása.

Állófázisként több poláris felület is alkalmazható, úgymint a szilikagél, az alumínium-oxid, a cirkónium-oxid, a titán-dioxid, a poláris módosított szilikagélek (amino-, nitril-, diol stb.), az anioncserélők, a kationcserélők és az ikeriont tartalmazó állófázisok. A mozgófázis kiválasztásához az állófázis polaritását kell figyelembe vennünk, hiszen az állófázis polaritásánál kisebb polaritással rendelkező oldószert kell választanunk az elválasztáshoz. Az eluensnek minden esetben tartalmaznia kell kis mennyiségű vizet is, amely egyben a legerősebb mozgófázis összetevő, a víz mennyiségét növelve az anyagok retenciója csökken. Azonban túlzott mennyiségű víz alkalmazása esetén a vegyületek szinte kizárólag a mozgófázisban tartózkodnak és a holtidőhöz közel eluálódnak az oszlopról, ezért a víztartalom általában nem nagyobb 30-40%-nál. Az eluenselegy a víz mellett tartalmazhat metanolt, acetonitrilt, tetrahidrofuránt stb., az oldószerek elúciós erőssége az alábbiak szerint alakul:

víz > metanol > acetonitril > tetrahydrofuran

Ezzel szemben az eluensek szelektivitása fordítottan változik az elúciós erősséggel [146].

A mintáink elválasztásához egy Phenomenex Luna HILIC (5 μm ; 250 x 4,6 mm) oszlopot alkalmaztunk. Ez egy, a normál fázisú kromatográfiában is gyakran használt állófázist, szilikagélt tartalmazó oszlop. A két rendszer közötti eltérés a mozgófázisban keresendő. Amíg a normál fázisú kromatográfiában az eluens nem tartalmaz vizet, ezért a szilanol csoportok nem disszociált formában vannak jelen, addig a HILIC módszer esetén az eluens víztartalma biztosítja, hogy a szilanol csoportok a pH függvényében disszociált állapotba kerülhessenek. Emellett a HILIC alapú elválasztásnál az eluens víztartalma azért is fontos, mert a szilanol csoportokhoz fizikailag szorbeálódott víz adja azt a határfelületi réteget, amibe a vizsgálandó komponensek beoldódnak (15. ábra).

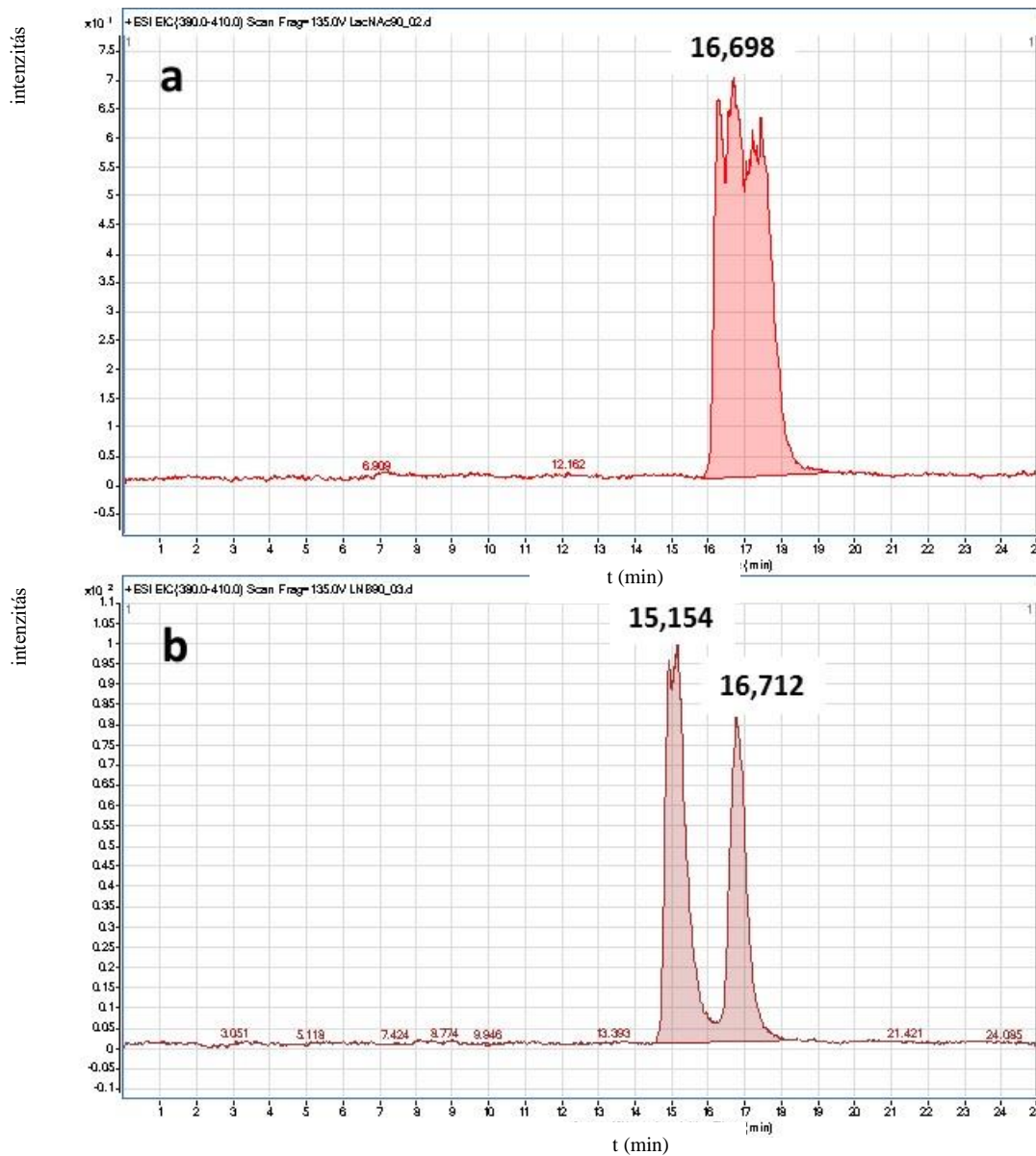


15. ábra – A HILIC állófázisául szolgáló szilikagél szilanol csoportjainak pH-függése (a), és a szilanol csoportokhoz szorbeálódott víz alkotta határfelületi réteg (b) [146].

A méréseink során acetonitril/metanol és víz különböző arányú elegyeit alkalmaztuk az izokratikus futtatásokhoz, 25 °C-os hőmérsékleten, 1 ml/perc áramlási sebesség mellett. A detektáláshoz tömegspektrométert alkalmaztunk pozitív ESI módban, kvadrupól analizátorral. Az elválasztás optimalizálását acetonitril:víz 75:25, V/V eluenseleggyel kezdtük, amely rendszerben a LNB 5,54 percnél, a LacNAc pedig 5,70 percnél eluálódott, elválást nem mutattak, a csúcsok szélesek és torzak voltak, az anomerek egy csúcsban jöttek le az oszlopról. Mivel a víztartalom csökkentése nagyobb retenciós időt eredményez a HILIC rendszerekben, ezért a víztartalom csökkentésével próbáltuk megvalósítani az anyagok elválasztását. A különböző, csökkenő víztartalommal rendelkező eluenselegyek használatakor a LNB esetében az anomerek elválását tapasztaltuk, azonban a LacNAc esetében csak csúcscsúcsosodás történt, de az anomerek továbbra sem váltak el egymástól. A 16. ábrán bemutatott, acetonitril:víz 95:5, V/V eluenseleggyel futtatott kromatogramokon a csúcsalakok még mindig torzak, a LNB csúcsai 15,15 és 16,71 percnél, a LacNAc csúcsa pedig 16,70 percnél láthatók, vagyis elválást

továbbra sem mutatnak. Az elúcióhoz az acetonitrilt metanolra cserélve sem tudtuk megvalósítani az anyagok elválását.

Annak ellenére, hogy a HILIC irodalmi adatok alapján alkalmasnak ígérkezett anyatej oligoszacharidok elválasztására, mégsem nyújtotta azt a hatékonyságot, amit vártunk [147]. Ennek magyarázata lehet az LNB és a LacNAc szerkezetének nagyfokú hasonlósága, valamint a molekuláinknak az irodalomban vizsgált molekulákhoz képest jelentősen kisebb mérete is.

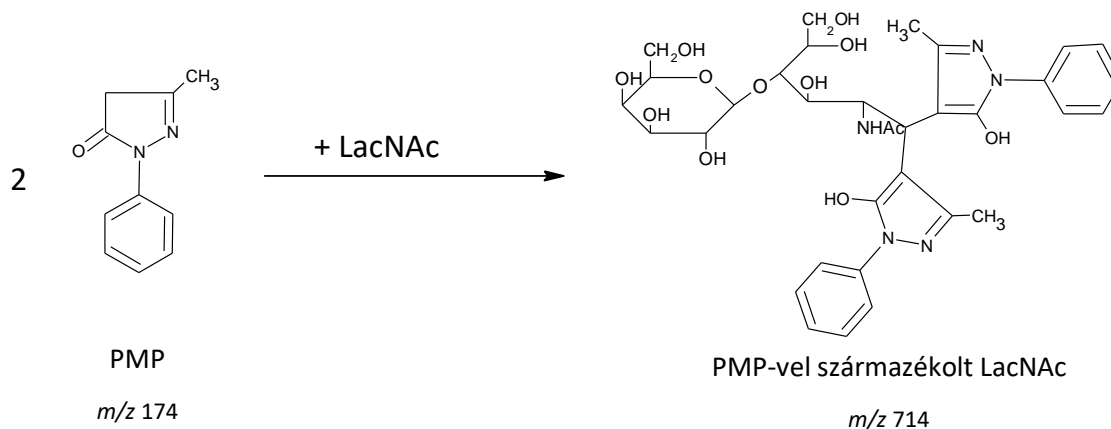


16. ábra - HILIC módszerrel történő elválasztás: a felső ábrán a LacNAc (a), az alsón az LNB (b) EIC (m/z 380,0 – 410,0) kromatogramja látható.

7.1.2. RP HPLC

A fordított fázisú kromatográfia irodalmi adatok alapján szintén alkalmas lehet anyatej oligoszacharidok elválasztására [125, 126]. A fordított fázisú kromatográfia főként megoszláson alapuló elválasztási módszer. Az állófázis egy módosított szilikagél (pl. oktadecil

csoportokkal fedett oszlop), a mozgófázis pedig valamilyen poláris oldószerkelet (víz, metanol, acetonitril, izopropanol stb.), aminek köszönhetően a rendszerben minél kevésbé poláris egy molekula, annál nagyobb a retenciója. Ebből következik, hogy az anyagaink vizsgálatára önmagában ez a rendszer nem alkalmas, azonban származékképzéssel csökkentve a polaritásukat, már megvalósítható az elválasztásuk. A szénhidrátok esetében ilyen tipikus származékképző az 1-fenil-3-metil-5-pirazolon (PMP) (**17. ábra**) [141].

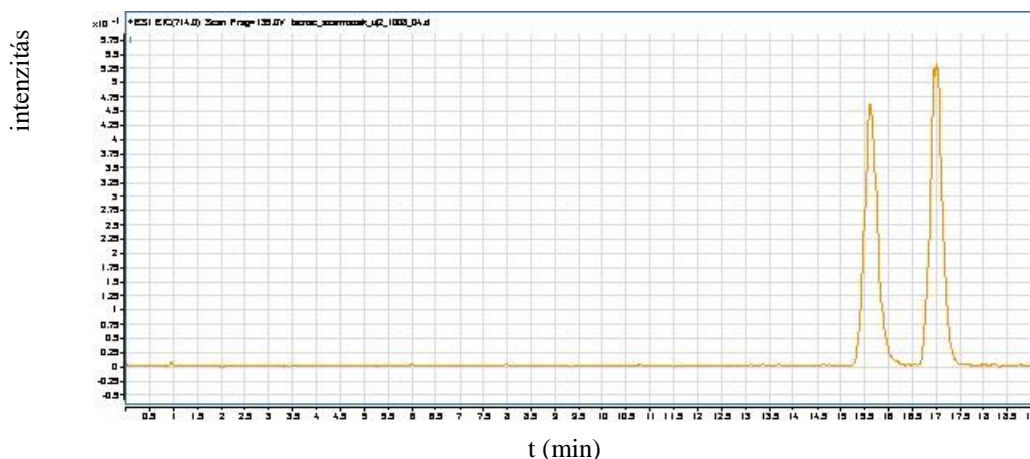


17.

17. ábra – LacNAc származékképzése PMP-vel fordított fázisú HPLC vizsgálatához. A cukrok RP kromatográfiás rendszerben való elválasztásához általában UV-aktív, apoláris (retenciót biztosító) módosításra van szükség.

Egyik ilyen tipikus származékképző reagens az 1-fenil-3-metil-5-pirazolon (PMP).

A standard anyagok vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy az LNB az alkalmazott magas hőmérsékletek (70 °C és 100 °C) mellett elbomlott, az *N*-acetillaktózin kromatogramján pedig rendre két csúcs jelent meg azonos, m/z 714 értékkel (**18. ábra**).



18. ábra - A PMP-LacNAc származék a fordított fázisú kromatográfiás rendszerben két kromatográfiás csúcsként jelenik meg, azonos, m/z 714 értékkel.

A **17. ábrán** bemutatott reakció alapján ezt a csúcskettőzést nem tudtuk egyszerűen értelmezni, ugyanis a származékképzés során megszűnt az α/β -anoméria, így csak egy csúcsot

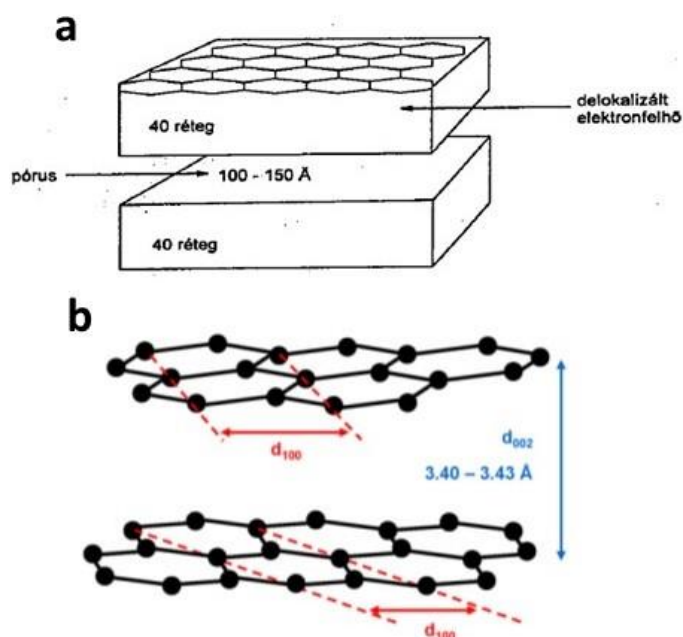
várnánk a standard minta származékképzését követően. A nem várt jelenség valószínűleg egy, a szerkezeten belül kialakuló gátolt rotáció miatt fellépő izoméria eredménye.

Mivel az elválasztás valószínűleg csak további származékképzési lépések beépítésével lett volna megvalósítható, ami azonban nagymértékben csökkentette volna a módszer ismételhetőségét, ezért a módszerfejlesztést porózus grafit állófázison folytattuk.

7.1.3. PGC alapú elválasztás és problémák

A porózus grafit állófázis alkalmazása a folyadékkromatográfiában olyan elválasztási problémákra ad lehetséges megoldást, amelyre más rendszerek nem képesek: egyedülálló retenciót és elválasztást képes biztosítani az erősen poláris anyagokra, emellett pedig az állófázis sztereoselektív tulajdonságának köszönhetően a geometriai izomerek és más, közeli struktúrák elválasztása is megvalósítható a rendszerben [148, 149].

Az oszlop töltetétül szolgáló grafit részecskék gömbölyűek és porózusak, mikroszkopikusan azonban hexagonálisan elhelyezkedő szénatomok által alkotott lemezekből épülnek fel (19. ábra).

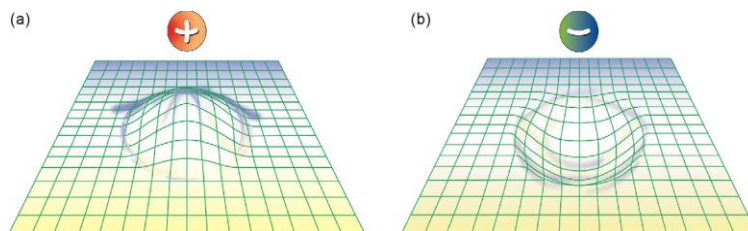


19. ábra - A porózus grafit állófázis makroszkopikus (a) [148] és mikroszkopikus (b) szerkezete [150].

Az elválasztást háromféle kölcsönhatás határozza meg:

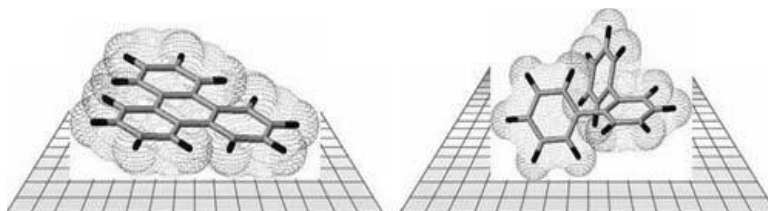
- Hidrofób/Diszperziós kölcsönhatás: a vizsgált anyag és a mozgófázis, valamint a vizsgált anyag és az állófázis grafit felszíne között. Így minél nagyobb a vizsgált anyag hidrofóbicitása, annál nagyobb a retenciója is.

- b) Töltésindukált kölcsönhatás (**20. ábra**): a poláris vizsgált anyag és a polarizálható grafit felszín között.



20. ábra – Az vizsgált anyagok polaritásuk függvényében eltérően viselkednek a polarizálható grafit felszínnel [149].

- c) Molekula térszerkezetének hatása (**21. ábra**): a planáris alkatú molekulák és a grafit állófázis sík felülete között erősebb kölcsönhatás jön létre, mint a kiterjedtebb térszerkezettel rendelkező „szférikus” molekulák esetén.



21. ábra – A planáris térszerkezetű molekulák (a) nagyobb felülettel érintkeznek a porózus grafit állófázissal, így erősebb kölcsönhatást alakítanak ki, mint a kiterjedtebb térszerkezetű (b) molekulák [149].

Tehát a vizsgált anyag állófázissal való kölcsönhatásának erőssége nagymértékben függ attól, hogy a molekula mely része kerül kapcsolatba az állófázissal és, hogy milyen funkcionális csoportokkal rendelkezik, amelyek kölcsönhatásba léphetnek a grafit felszínnel [148, 149].

A porózus grafit állófázis tulajdonságai lehetővé teszik, hogy szinte bármilyen oldószert, a pH teljes tartományát (0-14) és extrém magas hőmérsékletet is alkalmazunk az elválasztáshoz. A porózus grafit oszlopon tipikusan használt eluensek a metanol, az acetonitril, a tetrahydrofuran, a 2-propanol és a diklórometán [148, 149]. Ezek elúciós erőssége egymáshoz viszonyítva:

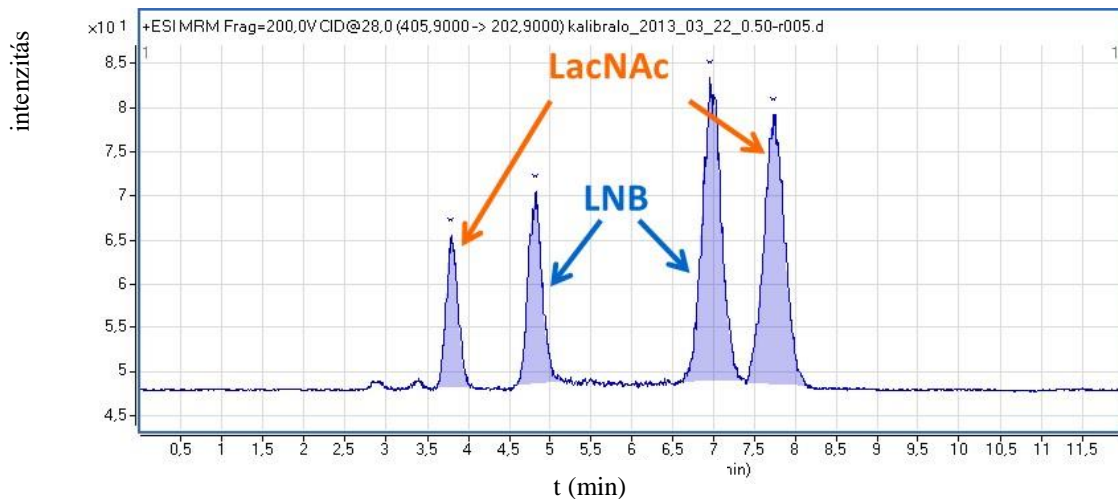
metanol < acetonitril < acetonitril : 2-propanol (1:1) < acetonitril : 2-propanol (1:3)

< tetrahydrofuran = diklórometán

A módszerfejlesztés kezdeti fázisában az elválasztást izokratikus elúcióval, metanol (14%) – víz (86%) eleggyel, 30 °C-on valósítottuk meg, 0,5 ml/perc áramlási sebesség mellett. Az elúcióhoz használt víz 0,1% V/V hangyasavat is tartalmazott, amelynek célja a detektáláskor

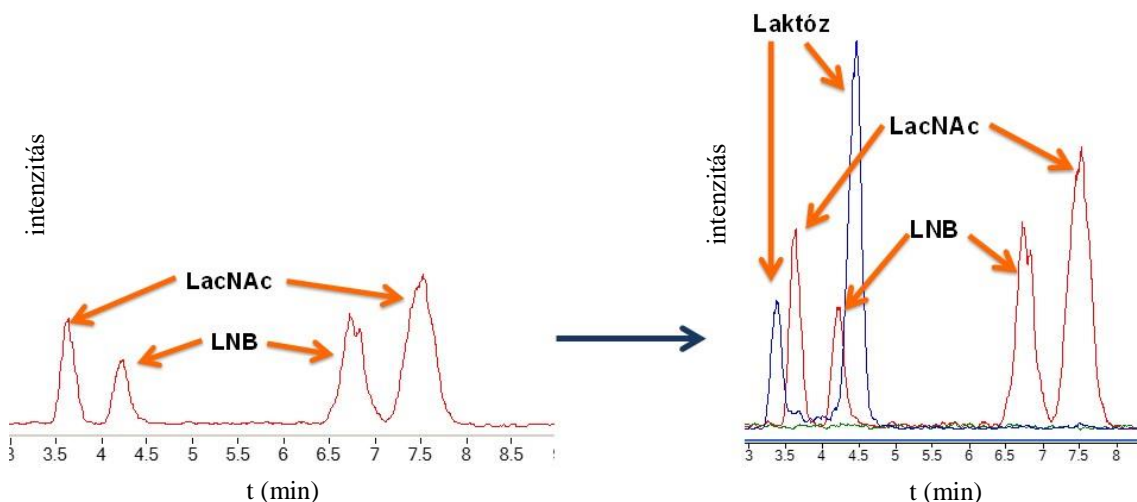
az ionizáció elősegítése volt, valamint tapasztalat szerint a hangyasav jelenléte szebb, élesebb csúcsokat eredményez a kromatogramon.

A rendszerben az anyagaink két csúcsot adtak, ami annak volt köszönhető, hogy a sztereoszelektív állófázison az α - és β -anomerek elváltak egymástól. A rendszerbe injektált LNB–LacNAc keverék kromatogramján négy, alapvonalon elváló csúcsot kaptunk, vagyis a két izomer vegyület elválasztását sikerült megvalósítanunk (**22. ábra**).



22. ábra – Az LNB és LacNAc standardok keverékének kromatogramján jól látható az α/β -anoméria miatt kialakuló csúcskettőződés; az így kapott négy csúcs alapvonalon elválnak.

Azonban tisztított, előkészített anyatej minták többszöri injektálásakor a csúcs alatti területek nagymértékű szórását, valamint retenciós idő stabilitási problémát tapasztaltunk. A jelenség okának felderítése érdekében felvettük anyatej minták totál ion kromatogramját (TIC), ami alapján látható, hogy az LNB és LacNAc elsőként eluálódó csúcaival együtt eluálódik az oszlopról a mintában maradványként jelenlévő laktóz is (**23. ábra**).



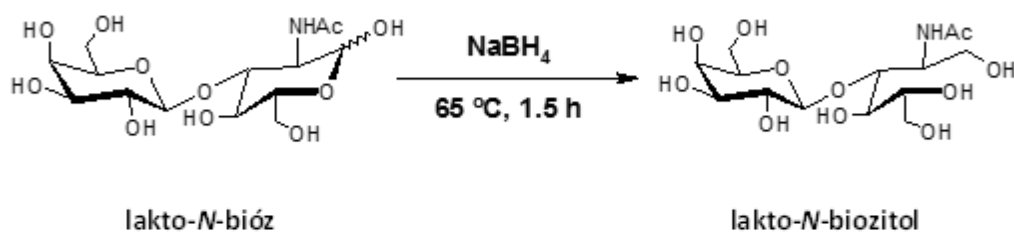
23. ábra – Amíg az MRM vizsgálat alapján (a) a négy csúcs alapvonalon elválását tapasztaltuk, az anyatej minta TIC kromatogramját felvéve egyértelművé vált a retenciós idő stabilitási problémájának oka: az LNB és LacNAc elsőként eluálódó csúcaival együtt eluálódik az oszlopról a mintában lévő laktóz két csúcsa.

A mintaelőkészítés során alkalmazott méretkizárásos oszlopkromatográfia az egyes szacharidok elválasztását szolgálja, a vizsgált diszacharidok, valamint a szintén diszacharid (és a LacNAc-LNB-hez képest nagy feleslegben jelenlévő) laktóz hasonló mérete és molekulatömege miatt tökéletes elválasztás nem érhető el. A mintában minden esetben marad az LNB és LacNAc koncentrációjával összemérhető mennyiségű laktóz, amely a koelúció miatt jelentős zavaró tényezőként lép fel.

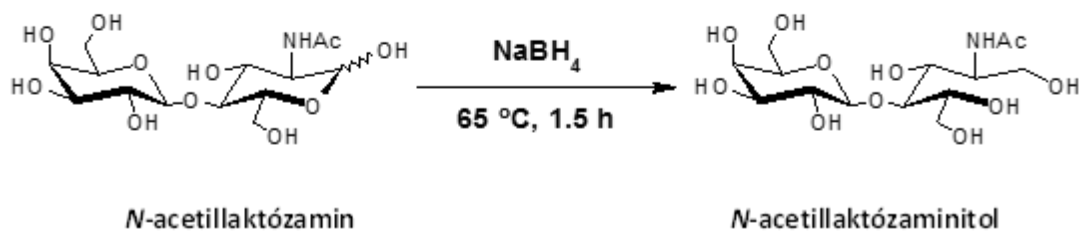
Ennek kiküszöbölésére első lépésben az elválasztás egyes paramétereit (eluens-összetétel, hőmérséklet, áramlási sebesség) módosítottuk, azonban a koelúciót semmilyen módon nem tudtuk megszüntetni.

A vizsgált molekulák két csúcsban való elúciójának – az α -/ β -anomerek elválása – az érzékenységre való kedvezőtlen hatását is figyelembe véve egy további mintaelőkészítési lépéssel bővítettük ki a módszerünket. Ennek során egy nátrium-borohidrides redukcióval megszüntettük az α -/ β -anomériát és következményesen a csúcskettőződést. A redukció mechanizmusa a **24. ábrán** látható. A redukció során a glikozidos hidroxilcsoportot tartalmazó gyűrű felnyílik és a megfelelő cukoralkohollá alakul át.

a



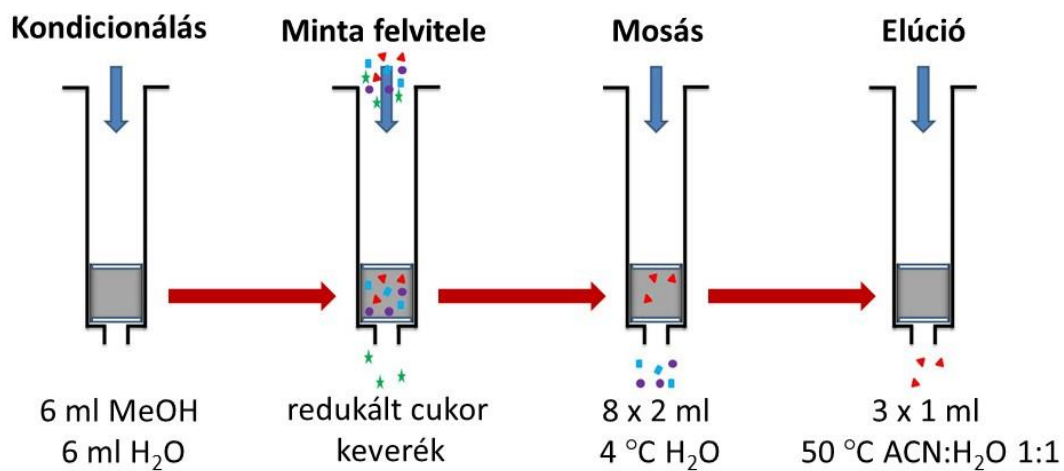
b



24. ábra - A 65 °C-os, 1,5 órás NaBH₄-es redukció a két vizsgált diszacharid példáján. A redukció eredményeként keletkező lakto-*N*-biozitol (a) és *N*-acetillaktózaminitol (b) már nem mutat α -/ β -anomériát.

A redukált standardok és minták kromatográfias analízisét megelőzően szilárdfázisú extrakcióval szükséges eltávolítani a keletkezett nátrium-metaborátot (NaBO₂) és az egyéb

sókat. Ezek jelenléte zavarná a tömegspektrometriás detektálást, valamint az állófázis erős szorpciós képessége miatt szorbeálódnának az állófázishoz, ezzel módosítva a kölcsönható felületet, ami jelentősen befolyásolná az elválást. A szilárdfázisú extrakció során a nem-pórusos grafit töltet kondicionálását és a minta felvitelét követően 4 °C-os vízzel szükséges mosni az állófázist. Ezen a hőmérsékleten a szacharidok az állófázishoz kötötten maradnak, azonban a jóval kisebb méretű és vízdékonyabb sók lemosódnak az állófázisról. Tömegspektrometriás mérésekkel is vizsgáltuk a mosás során nyert frakciókat, azonban azokban az esetlegesen kioldódott szacharidok mennyisége nem volt kimutatható. A szacharidok lemosása a nem-pórusos grafit állófázisról szobahőmérsékletű acetonitril:víz 1:1, V/V arányú keverékével történt (**25. ábra**).



25. ábra – A redukcióból visszamaradt sók szilárdfázisú extrakcióval kerültek eltávolításra az 5.1.1 fejezetben feltüntetett oszlopon. A nem-pórusos grafit állófázisú oszlop kondicionálását követően történik meg a minta felvitele, majd egy mosási lépéssel a sók lemosása, miközben a szacharidok az állófázishoz szorbeálódva maradnak. Végül a szorbeálódott szacharidok elúciója történik.

A redukált minták esetében izokratikus elúciós módszerrel sikerült alapvonalis elválást megvalósítanunk az LNB és a LacNAc, valamint a LacNAc és a laktóz között, emellett az LNB és a laktóz esetében is minimálisra csökkentettük a csúcsátfedést, ami már nem okozott jelentős csúcs alatti terület szórást.

Azonban az anyatej minták vizsgálata során a retenciós idő stabilitási probléma továbbra is jelentkezett, aminek legvalószínűbb oka, a gondos és többlépcsős mintaelőkészítés ellenére, a mintában maradó szennyezők adszorpciója az állófázisra. Ennek kiküszöbölésére egy mosási protokollt dolgoztunk ki (5.1.5 fejezet), ami minden egyes minta lefuttatását követően regenerálja az állófázis felületét, így biztosítva a kölcsönható felület mintáról mintára való állandóságát. A mosási protokoll bevezetését követően már nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget az egyes minták retenciós idejében.

7.1.4. Validáláskor figyelembe veendő tényezők

Biológiai minták validáláskor külön figyelmet kell fordítani a mátrixhatás vizsgálatára, hiszen jelentős mértékben ronthatja a módszer precizitását és érzékenységét. A mátrixhatás valójában azt jelenti, hogy az ionizáció hatékonysága a biológiai mátrixban jelenlévő koeluálódó anyagok hatására módosul. Azonban meghatározását nehezíti, hogy a mátrixhatás a kromatogramon általában nem észlelhető [151].

A mátrixhatás vizsgálata érdekében először anyatej minták és standard anyagok kromatogramját hasonlítottuk össze, amelyben interferenciát nem találtunk. A továbbiakban annak érdekében, hogy a mátrixhatást megfelelően számításba vegyük, a visszanyerhetőségi vizsgálatokhoz blank minta gyanánt nem spike-olt anyatejet használtunk, valamint ugyanezen anyatej mintát spike-oltuk az adott koncentrációk eléréséig. Az eredmények számításakor pedig az anyatej természetes LNB és LacNAc tartalmát figyelembe véve – amely jelentősen módosítaná a visszanyerési eredményeket – a kromatogramokon megjelenő csúcsok területe korrigálásra került a blank minták csúcs alatti területével.

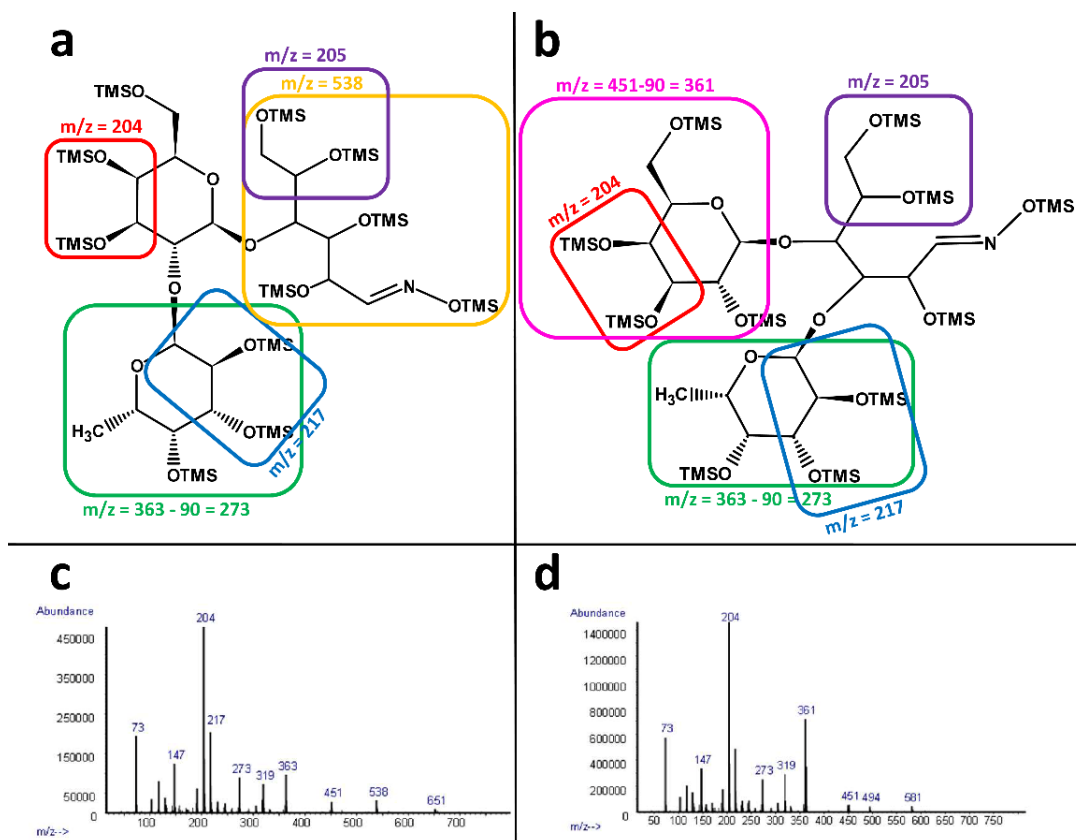
A kalibrációs egyenes elkészítésekor szintén kívánatos lenne a mátrixhatás lehető legteljesebb kiküszöbölése. Mivel a LacNAc és az LNB endogén komponensek, erre a legmegfelelőbb választás a standard addíció. Azonban figyelembe véve a korábban már ismertetésre került elválasztási kihívásokat, illetve a nehézkes, sok lépésből álló (előzetes méretkizárásos oszlopkromatográfia, redukció, szilárd fázisú extrakció) mintaelőkészítést, könnyen belátható, hogy a standard addíciós módszer nagyságrendekkel nagyobb mennyiségű anyatej mintát igényelne. Ezen szükséges mintamennyiség nem állt rendelkezésünkre, így a standard addíciós módszert már a validálás kezdetekor elvetettük. Annak érdekében, hogy bizonyítsuk, hogy a kalibrációnk megbízható eredményekkel szolgál, a standard addíciós módszert egy reprezentatív mintán teszteltük. Az ismertetett eredmények alapján igazoltuk, hogy a mátrix nem befolyásolta a módszer pontosságát.

7.2. 2'-FL és 3-FL vizsgálata

7.2.1. Fragmentációs mintázat értelmezése

A minták GC-MS analízist megelőző származékképzése elengedhetetlen, mivel a cukrok önmagukban GC-MS módszerrel nem vizsgálhatók. Azonban az általánosan használt TMS derivatizáció elméletileg hat egyedi izomer részecskéhez vezethet minden egyes redukáló szacharid (pl. 2'-FL vagy 3-FL) esetén, úgymint a ciklikus alfa- és béta-piranóz/furanóz párok és a két aciklikus forma. Ez a jelenség a két FL izomer azonosítását és mennyiségi

meghatározását túlzottan bonyolulttá tenné. Következésképpen, az önmagában történő szililezés nem ajánlott ebben az esetben, azonban egy előzetes oximálási lépéssel kombinálva már sokkal egyszerűbb profilt eredményez a származékképzés: a (Z) szin és az (E) antioxim származékokat [135]. Az FL-okban a galaktóz és glükóz egységeket egy béta-glikozidos kötés kapcsolja össze, így kialakítva a laktózt, majd a laktózhoz a fukóz alfa-glikozidos kötéssel kapcsolódik. Az egymást követő oximálási és szililezési lépések után a derivatizált 2'-FL és 3-FL két ciklikus monoszacharid egységből (galaktozilból és fukozilból származó egységek), illetve a „redukáló végen” található nyílt lánccal egységből (glükózból származó egység) áll. A 2'-FL és 3-FL közötti csekély szerkezetbeli különbséget jól tükrözi a fragmentációs mintázat. Az egyes származékolt FL-ek fragmentációs mintázata az ábrán látható (**26. ábra**). Amíg a 2'-FL esetében a két ciklikus monoszacharid egymáshoz kapcsolódik és az általuk alkotott fukozil-galaktozid diszacharid egység kapcsolódik a nyílt lánccal részhez, addig a 3-FL esetében a két ciklikus monoszacharid külön-külön kapcsolódik a nyílt lánccal részhez. Habár a két szerkezet, és ezáltal a fragmentációs mintázatuk is nagyon hasonló, a fukóz alegység eltérő kapcsolódási pozíciója miatt mégis megkíséreltük izomerspecifikus fragmensek azonosítását, amelyek alkalmasak lehetnek a mennyiségi meghatározásra.



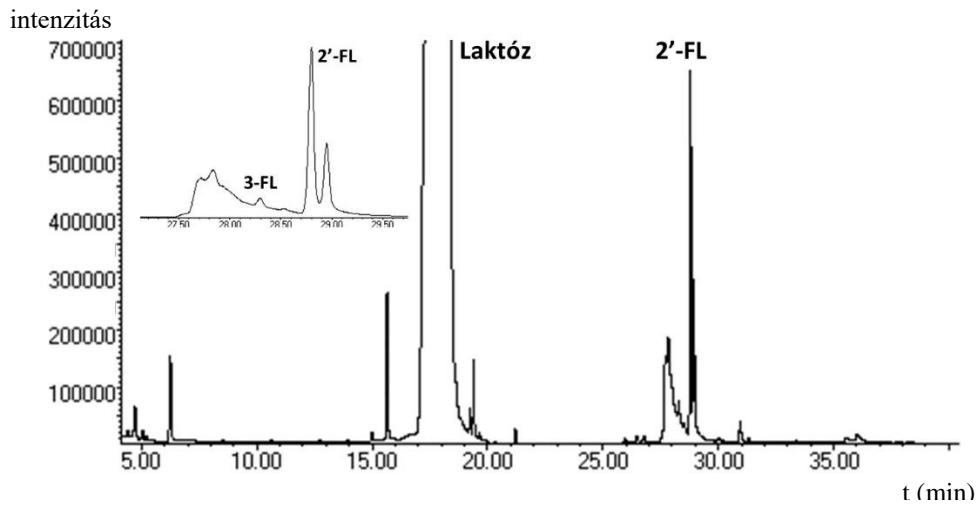
26. ábra – A 2'-O-fukozilaktóz (a és c) és a 3-O-fukozilaktóz (b és d) trimetilszilil oxim származékának feltételezett fragmentációs mintázata, valamint tömegspektruma. Általánosságban az m/z 73 a TMSO gyökionra, az m/z 90 tömegkülönbség pedig a TMSOH semleges veszteségre utal.

A fragmentációs mintázatban az egyes fragmensek az alábbi módon azonosíthatók: az m/z 73 a TMSO gyökionra, amíg az m/z 90 tömegkülönbség a TMSOH neutrális veszteségre utal. Az m/z 363 fragmension a derivatizált fukóz egység tömegét takarja, így mindkét FL-ra jellemző. További TMSOH vesztes figyelhető meg a fukóz gyűrűből is: m/z 273 = 363-90. Szintén mindkét vizsgálat anyagra jellemző az m/z 204 fragmens, ami a vicinális diol szerkezeti egység TMS-származékára utal, az m/z 217 fragmens pedig a fukóz gyűrűből származó ion.

Az ismertett fragmenseken felül a fukóz eltérő kapcsolódási helye a vizsgált FL-okra szelektív fragmensek megjelenését eredményezi. A 2'-FL esetében az m/z 538 fragmens a nyílt gyűrűs egység veszteségre utal, amely szerkezet a 3-FL-ben nem található meg. A 3-FL esetében a terminális galaktóz gyűrű veszteséje eredményezi a szelektív m/z 451 fragmenst, egy további TMSOH veszteséssel pedig az m/z 361 = 451-90 fragmenst. A szelektív fragmenseknek köszönhetően a 2'-FL és 3-FL nemcsak a retenciós idejük, de a fragmentációs mintázatuk alapján is könnyedén azonosíthatóvá váltak.

7.2.2. Kromatográfias megfontolások

A rendkívül specifikus tömegspektrometriás detektálás mellett sok esetben a mennyiségi meghatározáshoz nincs szükség alapvonal elválásra. Másrészt viszont az oligoszacharidok gyakran nagyon hasonló fragmentációs mintázattal rendelkeznek, ahol a mennyiségi meghatározásra leginkább alkalmas, legnagyobb mennyiségben előforduló ion éppen egy nem specifikus fragmens [134, 135]. Továbbá ismert, hogy az anyatejben megtalálható endogén szacharidok koncentrációjában több nagyságrendnyi eltérés figyelhető meg: a laktóz magas, közel 70 g/l koncentrációja mellett az oligoszacharidok jóval alacsonyabb, mindösszesen 5-15 g/l koncentrációban fordulnak elő [2]. Az anyatej tipikusan 0-3,8 g/l 2'-FL-t és 0,04-1,1 g/l 3-FL-t tartalmaz [152, 153]. Ezen tényezőket figyelembe véve ahhoz, hogy az anyatejben megtalálható egyéb, potenciálisan interferáló szacharidok jelenlétében is megbízható mennyiségi meghatározást biztosítsunk a 2'-FL-ra és a 3-FL-ra, a megfelelő kromatográfias elválasztás elengedhetetlen volt. A kidolgozott GC-MS módszer kielégítő elválasztást biztosít a kapcsolódási izomerekre, biológiai mátrixból történő vizsgálat esetében is (27. ábra).



27. ábra - Egy derivatizált anyatej minta GC-MS TIC ujjlenyomata. A kinagyított rész a 2'-FL és 3-FL kromatográfiai csúcsait ábrázolja.

Vitathatatlan előnye a módszernek, hogy képes a vizsgált izomereket megfelelően elválasztani a nagy mennyiségben jelenlévő laktóztól, amely lehetővé teszi az anyatej oligoszacharidok direkt analízisét olyan előzetes, időigényes mintaelőkészítési lépések nélkül, mint a méretkizárásos oszlop kromatográfia (gélszűrés), amely egyébként az általánosan használt módja a laktóz eltávolításának [82].

8. Következtetések

8.1. Lakto-*N*-bióz és *N*-acetillaktózamin jelenléte az anyatejben

Munkánk során nem csupán egy megfelelő, tömegspektrometriával kapcsolt kromatográfias módszer kidolgozása volt a cél, hanem anyatej minták vizsgálata is. Egészséges önkéntesektől származó, a laktáció első hetében begyűjtött mintákat vizsgáltunk, mivel irodalmi adatok alapján az oligoszacharidok mennyisége a szülés körüli napokban a legmagasabb, majd idővel folyamatosan csökken. A mintákban egyaránt sikeresen azonosítottuk és mennyiségileg jellemeztük a LacNAc-ot és az LNB-t. Ezzel az irodalomban elsőként azonosítottunk anyatej mintákban fehérjéhez nem kötött LNB-t, illetve elsőként jellemeztük mindkét anyag koncentrációját. A vizsgált anyagok koncentrációja a laktáció első napját követően szignifikánsan csökkent, amely csökkenő tendencia a laktáció további napjaiban folytatódott. A laktáció első hetének végére a LacNAc mennyisége a kvantifikálási határ közelébe csökkent, az LNB pedig már nem is volt detektálható a mintákban. A LacNAc koncentrációja 310 µg/ml-ről 6,7 µg/ml-re csökkent, az LNB koncentrációja pedig 26 µg/ml-ről egészen az LOD alá csökkent. A végső koncentrációk minden esetben 1 ml anyatejre lettek megadva és a hígítási faktort figyelembe véve korrigálásra kerültek.

Az anyatejben természetes körülmények között az 1-es típusú oligoszacharidok – amelyekben a laktózhoz egy LNB egység kapcsolódik – dominálnak a 2-es típusú oligoszacharidok fölött, amelyekben pedig a laktózhoz kapcsolódó építőelem a LacNAc. Ez az arány specifikus az anyatejre. Más emlősök teje, különösképpen a főemlősök (új- és óvilági majmok és emberszabásúak) teje túlnyomóan vagy kizárólagosan 2-es típusú oligoszacharidokat tartalmaznak, így az 1-es típusú oligoszacharidok túlsúlya emberi tulajdonságnak tekinthető [118]. Érdekes, hogy ezzel szemben a fehérjéhez nem kötött LNB és LacNAc aránya éppen ellentétes az 1-es és 2-es típusú oligoszacharidok arányával. Azonban ennek a jelenségnek a magyarázata további vizsgálatokat igényel.

A szabad, fehérjéhez nem kötött LNB és LacNAc jelenléte az anyatejben utalhat arra, hogy az oligoszacharidok bioszintézise során a laktóz egység elongációja LNB és LacNAc építőegységekkel történik, nem pedig monoszacharidokkal, vagy a diszacharidoknál komplexebb struktúrákkal. Reményeink szerint az itt bemutatott eredmények hozzájárulnak majd az oligoszacharidok pontos bioszintézisének feltárásához.

8.2. 2'-FL és 3-FL mennyiségi jellemzése, biológiai relevancia

Ahogy az az eredmények fejezetben bemutatásra került, a 2'-FL és a 3-FL koncentrációja egyaránt közel állandó volt a laktáció első hetében, és a *B* donortól származó minták alapján azt is meg tudtuk állapítani, hogy mennyiségük a szülést követő 1 és 2 hónappal sem mutatott jelentős csökkenést. Így az adatok alapján megállapíthatjuk, hogy mindkét anyag koncentrációja az anyatejben hosszú időn keresztül változatlan marad.

Egy közelmúltban megjelent tanulmány szerint, ha a 2'-FL/3-FL aránya az anyatejben meghaladja a 6,5-öt, az specifikus markere lehet, hogy az adott személy szekretor státuszú (pl. expresszálja a fukoziltranszferáz 2 enzimet) [154].

A jelen vizsgálatban szereplő két donor esetében a 2'-FL/3-FL aránya az alábbi volt: *A* donorra nézve 15, *B* donorra nézve pedig 20. Ezek alapján mindkét donor személy szekretor státuszú. Azonban közismert tény, hogy az egyének anyatej összetételében hatalmas különbségek fedezhetők fel a táplálkozás, az életmód, az etnikum, de akár a laktációs nap alapján is, amik mind befolyásolhatják a 2'-FL/3-FL arányszámot.

9. Összefoglalás

Az anyatejben található, fehérjéhez nem kötött és tápláló funkcióval nem rendelkező oligoszacharidok számos kedvező élettani hatással rendelkeznek, így a tápszergyártók egyre nagyobb figyelmet fordítanak ezen vegyületek kutatására. PhD munkám első részében az anyatej oligoszacharidokat felépítő két legfontosabb építőelem, az LNB és a LacNAc azonosítására és mennyiségi meghatározására alkalmas, validált HPLC-MS módszer került kifejlesztésre. A módszer előnye, hogy képes elválasztani egymástól ezt a két, szerkezetileg és kromatográfiás szempontból is nagyon hasonló viselkedésű kapcsolódási izomert. Az újonnan kifejlesztett módszerrel elsőként tudtuk azonosítani az anyatejben megtalálható, fehérjéhez nem kötött LNB-t és LacNAc-ot, valamint nyomon követni koncentrációjuk változását a laktáció első hetében. Az eredmények közelebb vihetnek az anyatej oligoszacharidok bioszintézisének pontos feltárásához. Emellett a tápszergyártó cégeknek is hasznos információval szolgálhat, hiszen, ha az LNB és a LacNAc megtalálhatók az anyatejben, akkor – feltételezve fontos biológiai szerepüket – előnyös lehet, ha a jövőben a tápszereket a két említett diszacharid felhasználásával teszik még teljesebbé.

PhD munkám második részében elsőként került kifejlesztésre egy validált GC-MS módszer a 2'-FL és 3-FL anyatejből történő meghatározására és mennyiségi jellemzésére. Az analízist megelőzően hidroxilaminnal és hexametildiszilazánnal TMS-oximos származékképzést végeztünk, hogy a hőre érzékeny triszacharidokat kellően illékonyá tegyük a GC-MS mérések elvégzéséhez. A TMS-oxim származékok fragmentációs mintázatát részletesen értelmeztük és azonosítottuk a 2'-FL-ra (m/z 538), valamint a 3-FL-ra (m/z 451 és 361) karakterisztikus fragmenseket. A bemutatott módszer a 2'-FL és a 3-FL pontos és precíz mennyiségi meghatározását teszi lehetővé komplex biológiai mintából a rendkívül nagy mennyiségben jelenlévő diszacharid laktóz mellett, a mintaelőkészítést nehezítő előzetes méretkizárásos elválasztási lépés nélkül. Az eredmények alapján mindkét vizsgált anyag nagy koncentrációban található meg az anyatejben a laktáció első hetében és koncentrációjukban szignifikáns változás nem figyelhető meg ez idő alatt. Jelenleg a tápszergyártó cégek nagy erőfeszítéseket tesznek arra, hogy a tápszereket anyatej oligoszacharidokkal dúsítsák, az első fuko-zillaktózt tartalmazó tápszer 2017-ben került forgalomba. Így a kidolgozott GC-MS módszer – különböző anyatej minták vizsgálata mellett – hasznos lehet ezen tápszerek minőségellenőrzése során is.

10. Summary

The unconjugated oligosaccharides found in the human milk are non-nutritive to the infant but possess several favourable biological effects. Therefore, the research on the characterization of these molecules became a new focus for the pharmaceutical industry. In this PhD thesis a new, validated HPLC-MS method for the identification and quantification of LNB and LacNAc – the two key building blocks of HMOs – is discussed. The main advantage of the developed method is that these structurally highly similar linkage isomers with subtle differences in chromatographic behaviour could be separated. Using the developed method, we could identify the free LNB and LacNAc content (not attached to proteins) of the human milk and also follow the concentration changes throughout the first week of lactation for the first time. These results can bring us closer to understanding the detailed biosynthesis of human milk oligosaccharides. In addition, these results could be appreciated by the pharmaceutical/food industry as if LNB and LacNAc can be found in the human milk – assuming their important biological role – it can be beneficial to enrich baby formulas with these isomers in the future.

As an other part of this PhD thesis, a validated GC-MS method has been developed for the identification and quantification of 2'-FL and 3-FL from human milk samples for the first time. The sample preparation included a TMS-oxime derivatization with hexamethyldisilazane to convert these trisaccharides into more volatile derivatives, amenable to GC-MS analysis. The fragmentation pattern of the TMS-oxime derivatives was discussed in details and the characteristic fragments of 2'-FL (m/z 538) and 3-FL (m/z 451 and 361) were identified. The discussed method allows the precise and accurate identification of 2'-FL and 3-FL from complex biological samples containing a large amount of lactose without the time-consuming and multi-step size-exclusion chromatographic sample preparation. Our results showed that both compounds are found in human milk during the first week of lactation in high concentrations and the concentration changes are not significant throughout this period. The pharmaceutical industry puts huge effort to enrich baby formulas with oligosaccharides and as a result of their effort the first infant formula containing fucosyllactose has been marketed in 2017. Hence, our developed GC-MS method – besides analysing various human milk samples – can be valuable in the quality control of the above mentioned infant formulas, too.

11. Irodalomjegyzék

1. Bode L. (2012) Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. *Glycobiology*, 22: 1147-1162.
2. Zivkovic A M, German J B, Lebrilla C B, Mills D A. (2011) Human milk glycobiome and its impact on the infant gastrointestinal microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 Suppl 1: 4653-4658.
3. Coppa G V, Pierani P, Zampini L, Carloni I, Carlucci A, Gabrielli O. (1999) Oligosaccharides in human milk during different phases of lactation. *Acta paediatrica* (Oslo, Norway : 1992). Supplement, 88: 89-94.
4. Gabrielli O, Zampini L, Galeazzi T, Padella L, Santoro L, Peila C, Giuliani F, Bertino E, Fabris C, Coppa G V. (2011) Preterm milk oligosaccharides during the first month of lactation. *Pediatrics*, 128: e1520-1531.
5. Kunz C, Rudloff S, Baier W, Klein N, Strobel S. (2000) OLIGOSACCHARIDES IN HUMAN MILK: Structural, Functional, and Metabolic Aspects. *Annual Review of Nutrition*, 20: 699-722.
6. Fanaro S, Boehm G, Garssen J, Knol J, Mosca F, Stahl B, Vigi V. (2005) Galacto-oligosaccharides and long-chain fructo-oligosaccharides as prebiotics in infant formulas: a review. *Acta paediatrica* (Oslo, Norway : 1992). Supplement, 94: 22-26.
7. Tissier H. (1900) Recherches sur la flora intestinale de nourissons (état normal et pathologique).
8. Moro E. (1900) Morphologie und bakteriologische Untersuchungen über die Darmbakterien des Säuglings: Die Bakterien-flora des normalen Frauenmilchstuhls. *Jahrbuch Kinderh.*, 61: 686-734.
9. Escherich T. (1886) Die Darmbakterien des Säuglings und ihre Beziehungen zur Physiologie der Verdauung.
10. Montreuil J. (1992) The saga of human milk gynolactose.
11. Polonowski M, Lespagnol A. (1931) Sur deux nouveaux sucres du lait de femme, le gynolactose et l'allolactose. *C R Acad Sci*, 192: 1319.
12. Polonowski M, Montreuil J. (1954) Etude chromatographique de polyosides du lait de femme. *C R Acad Sci Paris*, 238: 2263-2264.
13. Schönfeld H. (1926) Über die Beziehung der einzelnen Bestandteile der Frauenmilch zur Bifidusflora. *Jahrbuch Kinderh.*, 113: 19-60.
14. György P, Hoover J R E, Kuhn R, Rose C S. (1954) Bifidus factor. III. The rate of dialysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 48: 209-213.
15. Ninonuevo M R, Park Y, Yin H, Zhang J, Ward R E, Clowers B H, German J B, Freeman S L, Killeen K, Grimm R, Lebrilla C B. (2006) A Strategy for Annotating the Human Milk Glycome. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 7471-7480.
16. Work Group on Breastfeeding (2005) Breastfeeding and the Use of Human Milk. *Pediatrics*, 115: 496.
17. WHO (2002), Infant and young child nutrition - Global strategy on infant and young child feeding. Fifty-Fifth World Health Assembly.
18. Papp Z, A szülészet-nőgyógyászat tankönyve. 2009, Budapest: Semmelweis Kiadó és Multimédia Stúdió.
19. Ballard O, Morrow A L. (2013) Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatric clinics of North America*, 60: 49-74.
20. Jenness R. (1979) The composition of human milk. *Seminars in perinatology*, 3: 225-239.
21. Picciano M F. (2001) Nutrient composition of human milk. *Pediatr Clin North Am*, 48: 53-67.
22. Greer F R. DO BREASTFED INFANTS NEED SUPPLEMENTAL VITAMINS? *Pediatric Clinics*, 48: 415-423.

23. Dawodu A, Zalla L, Woo J G, Herbers P M, Davidson B S, Heubi J E, Morrow A L. (2014) Heightened attention to supplementation is needed to improve the vitamin D status of breastfeeding mothers and infants when sunshine exposure is restricted. *Maternal & child nutrition*, 10: 383-397.
24. Nommsen L A, Lovelady C A, Heinig M J, Lonnerdal B, Dewey K G. (1991) Determinants of energy, protein, lipid, and lactose concentrations in human milk during the first 12 mo of lactation: the DARLING Study. *Am J Clin Nutr*, 53: 457-465.
25. Bauer J, Gerss J. (2011) Longitudinal analysis of macronutrients and minerals in human milk produced by mothers of preterm infants. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 30: 215-220.
26. Saarela T, Kokkonen J, Koivisto M. (2005) Macronutrient and energy contents of human milk fractions during the first six months of lactation. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*, 94: 1176-1181.
27. Kent J, Mitoulas L, Cregan M, Geddes D, Doherty D A, Hartmann P. (2006) Volume and Frequency of Breastfeeding and Fat Content of Breast Milk Throughout the Day. *Pediatrics*, 117: e387-e395.
28. Work Group on Breastfeeding (1997) Breastfeeding and the Use of Human Milk. *Pediatrics*, 100: 1035.
29. Chua S, Arulkumaran S, Lim I, Selamat N, Ratnam S S. (1994) Influence of breastfeeding and nipple stimulation on postpartum uterine activity. *British journal of obstetrics and gynaecology*, 101: 804-805.
30. Kennedy K I, Lobbok M H, Van Look P F A. (1996) Lactational amenorrhea method for family planning. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 54: 55-57.
31. Cattaneo A, Yngve A, Koletzko B, Guzman L R. (2005) Protection, promotion and support of breast-feeding in Europe: current situation. *Public health nutrition*, 8: 39-46.
32. Kramer M S, Kakuma R. (2004) The optimal duration of exclusive breastfeeding: a systematic review. *Advances in experimental medicine and biology*, 554: 63-77.
33. Yngve A, Sjöström M. (2001) Breastfeeding in countries of the European Union and EFTA: current and proposed recommendations, rationale, prevalence, duration and trends. *Public health nutrition*, 4: 631-645.
34. Lawrence R M. (2013) Circumstances when breastfeeding is contraindicated. *Pediatric clinics of North America*, 60: 295-318.
35. Rowe H, Baker T, Hale T W. (2013) Maternal medication, drug use, and breastfeeding. *Pediatr Clin North Am*, 60: 275-294.
36. Moretti M E, Lee A, Ito S. (2000) Which drugs are contraindicated during breastfeeding? Practice guidelines. *Canadian Family Physician*, 46: 1753-1757.
37. Ridel K R, Leslie N D, Gilbert D L. (2005) An updated review of the long-term neurological effects of galactosemia. *Pediatric neurology*, 33: 153-161.
38. Thompson S M, Arrowsmith F E, Allen J R. (2003) Dietary management of galactosemia. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, 34 Suppl 3: 212-214.
39. Urashima T, Saito T, Nakamura T, Messer M. (2001) Oligosaccharides of milk and colostrum in non-human mammals. *Glycoconj J*, 18: 357-371.
40. Tao N, Wu S, Kim J, An H J, Hinde K, Power M L, Gagneux P, German J B, Lebrilla C B. (2011) Evolutionary glycomics: characterization of milk oligosaccharides in primates. *Journal of proteome research*, 10: 1548-1557.
41. Tao N, Depeters E J, Freeman S, German J B, Grimm R, Lebrilla C B. (2008) Bovine milk glycome. *Journal of dairy science*, 91: 3768-3778.
42. Boehm G, Stahl B. (2007) Oligosaccharides from Milk. *The Journal of nutrition*, 137: 847S-849S.
43. Consortium for Functional Glycomics. (2012) Symbol and Text Nomenclature for Representation of Glycan Structure.

<http://www.functionalglycomics.org/static/consortium/Nomenclature.shtml>.

44. Wu S, Tao N, German J B, Grimm R, Lebrilla C B. (2010) The development of an annotated library of neutral human milk oligosaccharides. *Journal of proteome research*, 9: 4138-4151.
45. Kobata A. (2010) Structures and application of oligosaccharides in human milk. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 86: 731-747.
46. Ramakrishnan B, Boeggeman E, Qasba P K. (2002) β -1,4-Galactosyltransferase and Lactose Synthase: Molecular Mechanical Devices. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 291: 1113-1118.
47. Rudloff S, Obermeier S, Borsch C, Pohlentz G, Hartmann R, Brösicke H, Lentze M J, Kunz C. (2006) Incorporation of orally applied ^{13}C -galactose into milk lactose and oligosaccharides. *Glycobiology*, 16: 477-487.
48. Fuhrer A, Sprenger N, Kurakevich E, Borsig L, Chassard C, Hennet T. (2010) Milk sialyllactose influences colitis in mice through selective intestinal bacterial colonization *J Exp Med*, 207: 2843-2854.
49. Bode L. (2009) Human milk oligosaccharides: prebiotics and beyond. *Nutrition reviews*, 67 Suppl 2: S183-191.
50. Kobata A. (2003) Possible application of milk oligosaccharides for drug development. *Chang Gung Med J.*, 26: 621-636.
51. Tsuchida A, Okajima T, Furukawa K, Ando T, Ishida H, Yoshida A, Nakamura Y, Kannagi R, Kiso M, Furukawa K. (2003) Synthesis of Disialyl Lewis a (Lea) Structure in Colon Cancer Cell Lines by a Sialyltransferase, ST6GalNAc VI, Responsible for the Synthesis of α -Series Gangliosides. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 22787-22794.
52. Roussel F, Knerr L, Schmidt Richard R. (2001) Solid-Phase Synthesis of Lactose-Containing Oligosaccharides. *European Journal of Organic Chemistry*, 2001: 2067-2073.
53. Knuhr P, Castro-Palomino J, Grathwohl M, Schmidt Richard R. (2001) Complex Structures of Antennary Human Milk Oligosaccharides – Synthesis of a Branched Octasaccharide. *European Journal of Organic Chemistry*, 2001: 4239-4246.
54. Jennum C A, Fenger T H, Bruun L M, Madsen R. (2014) One-Pot Glycosylations in the Synthesis of Human Milk Oligosaccharides. *European Journal of Organic Chemistry*, 2014: 3232-3241.
55. Xiao Z, Guo Y, Liu Y, Li L, Zhang Q, Wen L, Wang X, Kondengaden S M, Wu Z, Zhou J, Cao X, Li X, Ma C, Wang P G. (2016) Chemoenzymatic Synthesis of a Library of Human Milk Oligosaccharides. *The Journal of Organic Chemistry*, 81: 5851-5865.
56. Engfer M B, Stahl B, Finke B, Sawatzki G, Daniel H. (2000) Human milk oligosaccharides are resistant to enzymatic hydrolysis in the upper gastrointestinal tract. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71: 1589-1596.
57. Gnoth M, Kunz C, Kinne-Saffran E, Rudloff S. (2000) Human milk oligosaccharides are resistant to enzymatic hydrolysis in the upper gastrointestinal tract. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71: 1589-1596.
58. Sabharwal H, Nilsson B, Chester M A, Lindh F, Gronberg G, Sjoblad S, Lundblad A. (1988) Oligosaccharides from faeces of a blood-group B, breast-fed infant. *Carbohydr Res*, 178: 145-154.
59. Sabharwal H, Nilsson B, Chester M A, Sjoblad S, Lundblad A. (1984) Blood group specific oligosaccharides from faeces of a blood group A breast-fed infant. *Molecular immunology*, 21: 1105-1112.
60. Sabharwal H, Sjoblad S, Lundblad A. (1991) Sialylated oligosaccharides in human milk and feces of preterm, full-term, and weaning infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 12: 480-484.
61. Rudloff S, Kunz C. (2012) Milk Oligosaccharides and Metabolism in Infants. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 3: 398S-405S.

62. Albrecht S, Schols H A, Van Den Heuvel E G H M, Voragen A G J, Gruppen H. (2011) Occurrence of oligosaccharides in feces of breast-fed babies in their first six months of life and the corresponding breast milk. *Carbohydrate Research*, 346: 2540-2550.
63. Albrecht S, Schols H A, Van Den Heuvel E G H M, Voragen A G J, Gruppen H. (2010) CE-LIF-MSn profiling of oligosaccharides in human milk and feces of breast-fed babies. *ELECTROPHORESIS*, 31: 1264-1273.
64. Albrecht S, Schols H A, Van Zoeren D, Van Lingen R A, Groot Jebbink L J, Van Den Heuvel E G, Voragen A G, Gruppen H. (2011) Oligosaccharides in feces of breast- and formula-fed babies. *Carbohydr Res*, 346: 2173-2181.
65. Rudloff S, Pohlentz G, Borsch C, Lentze M J, Kunz C. (2012) Urinary excretion of in vivo ¹³C-labelled milk oligosaccharides in breastfed infants. *British Journal of Nutrition*, 107: 957-963.
66. Asakuma S, Hatakeyama E, Urashima T, Yoshida E, Katayama T, Yamamoto K, Kumagai H, Ashida H, Hirose J, Kitaoka M. (2011) Physiology of consumption of human milk oligosaccharides by infant gut-associated bifidobacteria. *The Journal of biological chemistry*, 286: 34583-34592.
67. Locascio R, Ninonuevo M, Freeman S, Al. e. (2007) Glycoprofiling of bifidobacterial consumption of human milk oligosaccharides demonstrates strain specific, preferential consumption of small chain glycans secreted in early human lactation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 8914-8919.
68. Euler A, Mitchell D, Kline R, Pickering L. (2005) Prebiotic effect of fructo-oligosaccharide supplemented term infant formula at two concentrations compared with unsupplemented formula and human milk. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 40: 157-164.
69. Knol J, Scholtens P, Kafka C, Steenbakkers J, Gro S, Helm K, Klarczyk M, Schopfer H, Bockler H, Wells J. (2005) Colon microflora in infants fed formula with galacto- and fructo-oligosaccharides: more like breast-fed infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 40: 36-42.
70. Ruiz-Palacios G M, Cervantes L E, Ramos P, Chavez-Munguia B, Newburg D S. (2003) *Campylobacter jejuni* Binds Intestinal H(O) Antigen (Fuc α 1, 2Gal β 1, 4GlcNAc), and Fucosyloligosaccharides of Human Milk Inhibit Its Binding and Infection. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 14112-14120.
71. Morrow A L, Ruiz-Palacios G M, Altaye M, Jiang X, Lourdes Guerrero M, Meinzen-Derr J K, Farkas T, Chaturvedi P, Pickering L K, Newburg D S. (2004) Human milk oligosaccharides are associated with protection against diarrhea in breast-fed infants. *The Journal of Pediatrics*, 145: 297-303.
72. Holmgren J, Svennerholm A M, Lindblad M. (1983) Receptor-like glycoconjugates in human milk that inhibit classical and El Tor *Vibrio cholerae* cell adherence (hemagglutination). *Infection and Immunity*, 39: 147-154.
73. Andersson B, Porras O, Hanson L Å, Lagergård T, Svanborg-Edén C. (1986) Inhibition of Attachment of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by Human Milk and Receptor Oligosaccharides. *Journal of Infectious Diseases*, 153: 232-237.
74. Downham M A, Scott R, Sims D G, Webb J K, Gardner P S. (1976) Breast-feeding protects against respiratory syncytial virus infections. *British Medical Journal*, 2(6030): 274-276.
75. Parkkinen J, Finne J, Achtman M, Väisänen V, Korhonen T K. (1983) *Escherichia coli* strains binding neuraminyl α 2-3 galactosides. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 111: 456-461.
76. Bode L. (2006) Recent advances on structure, metabolism, and function of human milk oligosaccharides. *The Journal of nutrition*, 136: 2127-2130.

77. Martin-Sosa S, Martin M J, Hueso P. (2002) The sialylated fraction of milk oligosaccharides is partially responsible for binding to enterotoxigenic and uropathogenic *Escherichia coli* human strains. *The Journal of nutrition*, 132: 3067-3072.
78. Hong P, Ninonuevo M R, Lee B, Lebrilla C, Bode L. (2009) Human milk oligosaccharides reduce HIV-1-gp120 binding to dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin (DC-SIGN). *British Journal of Nutrition*, 101: 482-486.
79. Angeloni S, Ridet J L, Kusy N, Gao H, Crevoisier F, Guinchard S, Kochhar S, Sigrist H, Sprenger N. (2005) Glycoprofiling with micro-arrays of glycoconjugates and lectins. *Glycobiology*, 15: 31-41.
80. Atochina O, Daly-Engel T, Piskorska D, Mcguire E, Harn D A. (2001) A Schistosome-Expressed Immunomodulatory Glycoconjugate Expands Peritoneal Gr1(+) Macrophages That Suppress Naive CD4(+) T Cell Proliferation Via an IFN- γ and Nitric Oxide-Dependent Mechanism. *The Journal of Immunology*, 167: 4293.
81. Atochina O, Harn D. (2005) LNFPIII/LeX-Stimulated Macrophages Activate Natural Killer Cells via CD40-CD40L Interaction. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12: 1041-1049.
82. Jantscher-Krenn E, Zherebtsov M, Nissan C, Goth K, Guner Y S, Naidu N, Choudhury B, Grishin A V, Ford H R, Bode L. (2012) The human milk oligosaccharide disialyllacto-N-tetraose prevents necrotising enterocolitis in neonatal rats. *Gut*, 61: 1417-1425.
83. Ádám V, A lipidek anyagcsereje - A szfingolipidek szerkezete és szintézise, In: Ádám V (szerk.), *Orvosi Biokémia*. Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 2006: 206-207.
84. Wang B. (2009) Sialic acid is an essential nutrient for brain development and cognition. *Annu Rev Nutr*, 29: 177-222.
85. Wang B, Yu B, Karim M, Hu H, Sun Y, Mcgreevy P, Petocz P, Held S, Brand-Miller J. (2007) Dietary sialic acid supplementation improves learning and memory in piglets. *Am J Clin Nutr*, 85: 561-569.
86. Wang B, Mcveagh P, Petocz P, Brand-Miller J. (2003) Brain ganglioside and glycoprotein sialic acid in breastfed compared with formula-fed infants. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78: 1024-1029.
87. Lucas A, Morley R, Cole T J, Gore S M, Lucas P J, Crowle P, Pearse R, Boon A J, Powell R. (1990) Early diet in preterm babies and developmental status at 18 months. *Lancet (London, England)*, 335: 1477-1481.
88. Lane J A, Mehra R K, Carrington S D, Hickey R M. (2011) Development of biosensor-based assays to identify anti-infective oligosaccharides. *Analytical biochemistry*, 410: 200-205.
89. Delgado S, Arroyo R, Jimenez E, Marin M L, Del Campo R, Fernandez L, Rodriguez J M. (2009) *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from breast milk of women suffering infectious mastitis: potential virulence traits and resistance to antibiotics. *BMC microbiology*, 9: 82.
90. Date J W. (1964) The Isolation of some Oligosaccharides from the Urine of Pregnant and Lactation Women. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, 16: 597-603.
91. Hallgren P, Lindberg B S, Lundblad A. (1977) Quantitation of some urinary oligosaccharides during pregnancy and lactation. *The Journal of biological chemistry*, 252: 1034-1040.
92. Tomsits E. *Csecsemőtáplálás, tápszerek*. 2015.
http://www.gyer2.sote.hu/AOKHUN/KONZ/konzultacio_18_csecsemotaplalas.pdf.
93. De Betue C T, Van Waardenburg D A, Deutz N E, Van Eijk H M, Van Goudoever J B, Luiking Y C, Zimmermann L J, Joosten K F. (2011) Increased protein-energy intake promotes anabolism in critically ill infants with viral bronchiolitis: a double-blind randomised controlled trial. *Arch Dis Child*, 96: 817-822.
94. Valeant. Humana. humana.hu.

95. Natura G. Tápszerek. <http://www.naturagyogyszertar.hu/Tapszerek/53/>.
96. Nestlé. nestlebaba.hu.
97. Smith J D, Clinard V, Barnes C L. (2011) Pharmacists' guide to infant formulas for term infants. *Journal of the American Pharmacists Association : JAPhA*, 51: e28-35; quiz e36-27.
98. Cho Y J, Sinha J, Park J P, Yun J W. (2001) Production of inulooligosaccharides from chicory extract by endoinulinase from *Xanthomonas oryzae* No. 5. *Enzyme and microbial technology*, 28: 439-445.
99. Moro G, Arslanoglu S, Stahl B, Jelinek J, Wahn U, Boehm G. (2006) A mixture of prebiotic oligosaccharides reduces the incidence of atopic dermatitis during the first six months of age. *Archives of Disease in Childhood*, 91: 814-819.
100. Schmelzle H, Wirth S, Skopnik H, Radke M, Knol J, Bockler H M, Bronstrup A, Wells J, Fusch C. (2003) Randomized double-blind study of the nutritional efficacy and bifidogenicity of a new infant formula containing partially hydrolyzed protein, a high beta-palmitic acid level, and nondigestible oligosaccharides. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 36: 343-351.
101. Rivero-Urgell M, Santamaria-Orleans A. (2001) Oligosaccharides: application in infant food. *Early human development*, 65 Suppl: S43-52.
102. Ruhaak L R, Lebrilla C B, 7 - Current methods for the analysis of human milk oligosaccharides (HMOs) and their novel applications, in *Metabolomics in Food and Nutrition*. 2013, Woodhead Publishing. p. 124-147.
103. Jones C J, Beni S, Limtiaco J F, Langeslay D J, Larive C K. (2011) Heparin characterization: challenges and solutions. *Annual review of analytical chemistry (Palo Alto, Calif.)*, 4: 439-465.
104. Wu L D, Ruhaak L R, Lebrilla C B. (2017) Analysis of Milk Oligosaccharides by Mass Spectrometry. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1503: 121-129.
105. Wu S, Grimm R, German J B, Lebrilla C B. (2011) Annotation and structural analysis of sialylated human milk oligosaccharides. *Journal of proteome research*, 10: 856-868.
106. Hermansson K, Jansson P E, Kenne L, Widmalm G, Lindh F. (1992) A ¹H and ¹³C NMR study of oligosaccharides from human milk. Application of the computer program CASPER. *Carbohydr Res*, 235: 69-81.
107. Martin-Pastor M, Bush C A. (2000) Conformational studies of human milk oligosaccharides using (1)H-(13)C one-bond NMR residual dipolar couplings. *Biochemistry*, 39: 4674-4683.
108. Van Leeuwen S S, Schoemaker R J W, Gerwig G J, Van Leusen-Van Kan E J M, Dijkhuizen L, Kamerling J P. (2014) Rapid milk group classification by ¹H NMR analysis of Le and H epitopes in human milk oligosaccharide donor samples. *Glycobiology*, 24: 728-739.
109. Galeotti F, Coppa G V, Zampini L, Maccari F, Galeazzi T, Padella L, Santoro L, Gabrielli O, Volpi N. (2014) Capillary electrophoresis separation of human milk neutral and acidic oligosaccharides derivatized with 2-aminoacridone. *Electrophoresis*, 35: 811-818.
110. Kottler R, Mank M, Hennig R, Muller-Werner B, Stahl B, Reichl U, Rapp E. (2013) Development of a high-throughput glycoanalysis method for the characterization of oligosaccharides in human milk utilizing multiplexed capillary gel electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis*, 34: 2323-2336.
111. Olivares M, Albrecht S, De Palma G, Ferrer M D, Castillejo G, Schols H A, Sanz Y. (2015) Human milk composition differs in healthy mothers and mothers with celiac disease. *European journal of nutrition*, 54: 119-128.
112. Bao Y, Chen C, Newburg D S. (2013) Quantification of neutral human milk oligosaccharides by graphitic carbon HPLC with tandem mass spectrometry. *Analytical biochemistry*, 433: 28-35.

113. Finke B, Mank M, Daniel H, Stahl B. (2000) Offline Coupling of Low-Pressure Anion-Exchange Chromatography with MALDI-MS to Determine the Elution Order of Human Milk Oligosaccharides. *Analytical biochemistry*, 284: 256-265.
114. Grey C, Edebrink P, Krook M, Jacobsson S P. (2009) Development of a high performance anion exchange chromatography analysis for mapping of oligosaccharides. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 877: 1827-1832.
115. Kunz C, Rudloff S, Hintelmann A, Pohlentz G, Egge H. (1996) High-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection and molar response factors of human milk oligosaccharides. *Journal of chromatography. B, Biomedical applications*, 685: 211-221.
116. Thurl S, Muller-Werner B, Sawatzki G. (1996) Quantification of individual oligosaccharide compounds from human milk using high-pH anion-exchange chromatography. *Analytical biochemistry*, 235: 202-206.
117. Ruhaak L R, Lebrilla C B. (2012) Advances in Analysis of Human Milk Oligosaccharides. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 3: 406S-414S.
118. Urashima T, Asakuma S, Leo F, Fukuda K, Messer M, Oftedal O T. (2012) The Predominance of Type I Oligosaccharides Is a Feature Specific to Human Breast Milk. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 3: 473S-482S.
119. Matsuki T, Yahagi K, Mori H, Matsumoto H, Hara T, Tajima S, Ogawa E, Kodama H, Yamamoto K, Yamada T, Matsumoto S, Kurokawa K. (2016) A key genetic factor for fucosyllactose utilization affects infant gut microbiota development. *Nature Communications*, 7: 11939.
120. Leo F, Asakuma S, Nakamura T, Fukuda K, Senda A, Urashima T. (2009) Improved determination of milk oligosaccharides using a single derivatization with anthranilic acid and separation by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography. A*, 1216: 1520-1523.
121. Shigehisa A, Sotoya H, Sato T, Hara T, Matsumoto H, Matsuki T. (2015) Characterization of a bifidobacterial system that utilizes galacto-oligosaccharides. *Microbiology*, 161: 1463-1470.
122. Charlwood J, Tolson D, Dwek M, Camilleri P. (1999) A Detailed Analysis of Neutral and Acidic Carbohydrates in Human Milk. *Analytical biochemistry*, 273: 261-277.
123. Galeotti F, Coppa G, Zampini L, Maccari F, Galeazzi T, Padella L, Santoro L, Gabrielli O, Volpi N, On-line high-performance liquid chromatography-fluorescence detection-electrospray ionization-mass spectrometry profiling of human milk oligosaccharides derivatized with 2-aminoacridone. *Vol. 430. 2012. 97-104.*
124. Chaturvedi P, Warren C D, Ruiz-Palacios G M, Pickering L K, Newburg D S. (1997) Milk oligosaccharide profiles by reversed-phase HPLC of their perbenzoylated derivatives. *Analytical biochemistry*, 251: 89-97.
125. Asakuma S, Urashima T, Akahori M, Obayashi H, Nakamura T, Kimura K, Watanabe Y, Arai I, Sanai Y. (2008) Variation of major neutral oligosaccharides levels in human colostrum. *European journal of clinical nutrition*, 62: 488-494.
126. Leo F, Asakuma S, Fukuda K, Senda A, Urashima T. (2010) Determination of sialyl and neutral oligosaccharide levels in transition and mature milks of Samoan women, using anthranilic derivatization followed by reverse phase high performance liquid chromatography. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 74: 298-303.
127. Mariño K, Lane J A, Abrahams J L, Struwe W B, Harvey D J, Marotta M, Hickey R M, Rudd P M. (2011) Method for milk oligosaccharide profiling by 2-aminobenzamide labeling and hydrophilic interaction chromatography. *Glycobiology*, 21: 1317-1330.
128. Shen Z, Warren C D, Newburg D S. (2000) High-performance capillary electrophoresis of sialylated oligosaccharides of human milk. *Analytical biochemistry*, 279: 37-45.

129. Bao Y, Zhu L, Newburg D S. (2007) Simultaneous quantification of sialyloligosaccharides from human milk by capillary electrophoresis. *Analytical biochemistry*, 370: 206-214.
130. Ninonuevo M, An H, Yin H, Killeen K, Grimm R, Ward R, German B, Lebrilla C. (2005) Nanoliquid chromatography-mass spectrometry of oligosaccharides employing graphitized carbon chromatography on microchip with a high-accuracy mass analyzer. *Electrophoresis*, 26: 3641-3649.
131. Chen Y, Xie M Y, Wang Y X, Nie S P, Li C. (2009) Analysis of the monosaccharide composition of purified polysaccharides in *Ganoderma atrum* by capillary gas chromatography. *Phytochemical analysis : PCA*, 20: 503-510.
132. Pitthard V, Finch P. (2001) GC-MS analysis of monosaccharide mixtures as their diethyldithioacetal derivatives: Application to plant gums used in art works. *Chromatographia*, 53: S317-S321.
133. Hounsell E, Davies M, Smith K, Monosaccharide Analysis by Gas Chromatography (GC), in *The Protein Protocols Handbook*, Walker J, Editor. 2002, Humana Press. p. 809-810.
134. Boldizar I, Fuzfai Z, Molnar-Perl I. (2011) Characteristic fragmentation patterns of trimethylsilyl and trimethylsilyl-oxime derivatives of plant disaccharides as obtained by gas chromatography coupled to ion-trap mass spectrometry. *Journal of chromatography. A*, 1218: 7864-7868.
135. Fuzfai Z, Boldizar I, Molnar-Perl I. (2008) Characteristic fragmentation patterns of the trimethylsilyl and trimethylsilyl-oxime derivatives of various saccharides as obtained by gas chromatography coupled to ion-trap mass spectrometry. *Journal of chromatography. A*, 1177: 183-189.
136. Pfenninger A, Karas M, Finke B, Stahl B, Structural Analysis of Underivatized Neutral Human Milk Oligosaccharides in the Negative Ion Mode by Nano-Electrospray MS(n) (Part 1: Methodology). Vol. 13. 2002. 1331-1340.
137. Pfenninger A, Karas M, Finke B, Stahl B. (2002) Structural analysis of underivatized neutral human milk oligosaccharides in the negative ion mode by nano-electrospray MSn (part 2: application to isomeric mixtures). *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 13: 1341-1348.
138. Weichert S, Jennewein S, Hufner E, Weiss C, Borkowski J, Putze J, Schrotten H. (2013) Bioengineered 2'-fucosyllactose and 3-fucosyllactose inhibit the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* and enteric pathogens to human intestinal and respiratory cell lines. *Nutrition research (New York, N.Y.)*, 33: 831-838.
139. Hoeflinger J L, Davis S R, Chow J, Miller M J. (2015) In vitro impact of human milk oligosaccharides on Enterobacteriaceae growth. *J Agric Food Chem*, 63: 3295-3302.
140. Efsa Panel on Dietetic Products N a A N. (2015) Safety of 2'-O-fucosyllactose as a novel food ingredient pursuant to Regulation (EC) No 258/97. *European Food Safety Authority Journal*, 13(7): 1-32.
141. Zhang L, Xu J, Zhang L, Zhang W, Zhang Y. (2003) Determination of 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone-labeled carbohydrates by liquid chromatography and micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography B*, 793: 159-165.
142. Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, Rebers P A, Smith F. (1956) Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28: 350-356.
143. Arias V C, Castells R C, Malacalza N, Lupano C E, Castells C B. (2003) Determination of Oligosaccharide Patterns in Honey by Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography. *Chromatographia*, 58: 797-801.
144. European Medicines Agency EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. (2011) Guideline on bioanalytical method validation. EMA,
145. US Food and Drug Administration. (2001) Guidance for industry: bioanalytical method validation.

146. Fekete J, A folyadékromatográfia újabb fejlesztési irányai HILIC. 2009, Budapest: Merck. 87.
147. Fong B, Ma K, Mcjarrow P. (2011) Quantification of bovine milk oligosaccharides using liquid chromatography-selected reaction monitoring-mass spectrometry. *J Agric Food Chem*, 59: 9788-9795.
148. Fekete J, Folyadékromatográfia elmélete és gyakorlata. 2006, Budapest: Edison House.
149. Thermo. Method Development Guide for Hypercarb Columns. 2007, [http://iris.fishersci.ca/LitRepo.nsf/0/FACAF1EAD7D130EF8525711C00690DC7/\\$file/HYP-006.pdf](http://iris.fishersci.ca/LitRepo.nsf/0/FACAF1EAD7D130EF8525711C00690DC7/$file/HYP-006.pdf).
150. West C, Elfakir C, Lafosse M. (2010) Porous graphitic carbon: a versatile stationary phase for liquid chromatography. *Journal of chromatography. A*, 1217: 3201-3216.
151. Taylor P J. (2005) Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry*, 38: 328-334.
152. Sumiyoshi W, Urashima T, Nakamura T, Arai I, Saito T, Tsumura N, Wang B, Brand-Miller J, Watanabe Y, Kimura K. (2003) Determination of each neutral oligosaccharide in the milk of Japanese women during the course of lactation. *The British journal of nutrition*, 89: 61-69.
153. Radzanowski G G, Garrett P N, Li X, Anita M. (2013) Short-chain milk oligosaccharide levels in human milk and infant plasma. *The FASEB Journal*, 27: 629.616.
154. Goehring K C, Kennedy A D, Prieto P A, Buck R H. (2014) Direct evidence for the presence of human milk oligosaccharides in the circulation of breastfed infants. *PloS one*, 9: e101692.

12. Saját publikációk jegyzéke

12.1. Az értekezés alapját képező közlemények

- 1) Qualitative and quantitative analysis of *N*-acetylactosamine and lacto-*N*-biose, the two major building blocks of human milk oligosaccharides in human milk samples by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry using a porous graphitic carbon column, R. Balogh, P. Jankovics, Sz. Béni, *Journal of Chromatography A*, 1422 (2015) 140-146.
- 2) Determination and quantification of 2'-*O*-fucosyllactose and 3-*O*-fucosyllactose in human milk by GC–MS as *O*-trimethylsilyl-oxime derivatives, R. Balogh, Sz. Szarka, Sz. Béni, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 115 (2015) 450-456.
- 3) Analytical characterization of human milk oligosaccharides - potential applications in pharmaceutical analysis, M. Grabarics, O. Csernák, R. Balogh, Sz. Béni, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 146 (2017) 168-178.
- 4) Az anyatej oligoszacharidok szerkezete, vizsgáló módszerei és biológiai szerepe. R. Balogh, Á. Rácz, Sz. Béni, *Gyógyszerészet*, 56(1) (2012) 18-23.

12.2. Más témákhoz kapcsolódó saját közlemények

- 1) Design and evaluation of cyclodextrin-based delivery systems to incorporate poorly soluble curcumin analogs for the treatment of melanoma, D. Michel, J. M. Chitanda, R. Balogh, P. Yang, J. Singh, U. Das, A. El-Aneed, J. Dimmock, R. Verrall, I. Badea, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 81(3) (2012) 548-556.
- 2) Permeability test for transdermal and local therapeutic patches using Skin PAMPA method, G. Vizserálek, Sz. Berkó, G. Tóth, R. Balogh, M. Budai-Szűcs, E. Csányi, B. Sinkó, K. Takács-Novák, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 76 (2015) 165-172.

13. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom a Semmelweis Egyetem Gyógyszerészi Kémiai Intézet jelenlegi és előző igazgatójának, Dr. Horváth Péternek és Dr. Noszál Béla Professzor Úrnak, hogy PhD tanulmányaimat és azt megelőzően, a későbbi PhD munkámmal szorosan összefüggő témaként Tudományos Diákköri munkámat az Intézet kötelékében végezhettem.

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Béni Szabolcsnak, aki a téma megválasztásával felkeltette érdeklődésemet az elválasztástechnika iránt, és aki PhD munkám során mindvégig segített és támogattott. Szakmai segítségükért és iránymutatásukért köszönettel tartozom még Dr. Jankovics Péternek, Dr. Szarka Szabolcsnak, Dr. Alberti-Dér Ágnesnek és Dr. Tóth Gergőnek, nélkülük ez a munka nem jöhetett volna létre.

Köszönöm a PhD munkám során velem dolgozó két Tudományos Diákköri hallgatónak dr. Grabarics Márkónak és dr. Tóth Andrásnak, hogy sokszor más szemszögből közelítették meg a szakmai problémákat és szorgalmukkal további lendületet adtak közös munkánknak.

Köszönettel tartozom a Semmelweis Egyetem Gyógyszerészi Kémiai Intézet, valamint a Farmakognóziái Intézet összes munkatársának a segítségéért, valamint az együttműködést és a segítséget minden szerzőtársamnak a közleményeink megírásában.

Köszönöm jelenlegi kollégáimnak az Országos Gyógyszerészeti és Élelmezés-egészségügyi Intézetből, hogy munkám mellett lehetővé tették PhD munkám befejezését, disszertációm megírását, valamint a szakmai és személyes inspirációjukat.

Legnagyobb köszönettel mégis családomnak tartozom. Szüleimnek, akik eddigi életemben mindvégig támogattak, egyengették az utamat, nélkülük – sok minden más mellett – a PhD munkám sem születhetett volna meg. Köszönöm kisfiamnak, Vizserálek Zsombornak, hogy minden nap mosolyt csal az arcomra, és motivál, hogy példát mutassak neki. Végül hálás köszönettel tartozom férjemnek, Dr. Vizserálek Gábornak, hogy igazi társam az életben, aki minden pillanatban támogat és mellettem áll, bármi is történjék.