

Anyatej oligoszacharidok analitikai jellemzése

Doktori tézisek

Balogh Réka

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok 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, professor emeritus
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Perjési Pál, egyetemi tanár
Dr. Ludányi Krisztina, egyetemi docens

Budapest
2018

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.

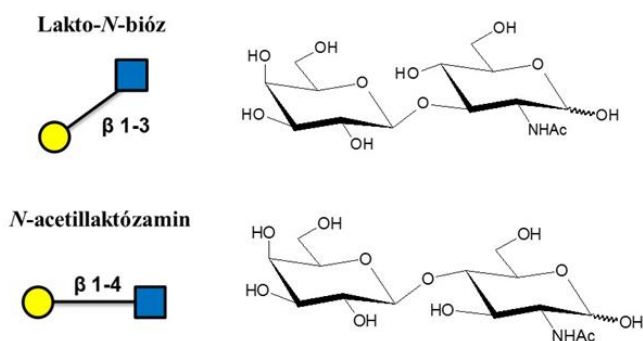
Az anyatej a legnagyobb mennyiségben előforduló lipidek, fehérjék és a laktóz mellett ezekkel összevethető, sőt a fehérjéket meghaladó mennyiségben tartalmaz oligoszacharidokat. Amíg az előbbieket főként tápláló funkciót töltenek be, addig a fehérjékkel nem konjugált, rendkívül változatos szerkezetű oligoszacharidok a csecsemők számára emészthetetlenek. 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 energiaveszteség lenne. 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.

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. 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.

Célkitűzés

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 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 (**1. 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.



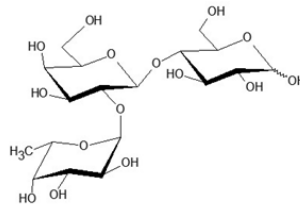
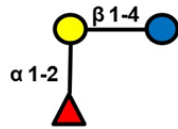
1. ábra - Az oligoszacharidok felépítésében fontos diszacharidok: a lakto-*N*-bióz (LNB) és az *N*-acetillaktózámin (LacNAc) szerkezete, és a Consortium for Functional Glycomics által elfogadott jelölése.

Feltételezésünk szerint a szabad formájú LNB és LacNAc előfordulása a kolosztrumban és az anyatejben nem lehet véletlen. 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 emellett 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.

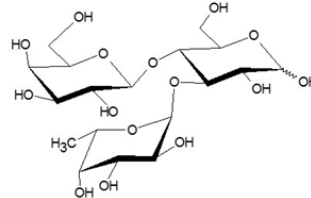
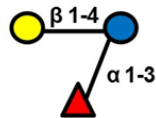
2) Triszacharidok vizsgálata gázkromatográfiával

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. 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 mennyiségét illetően.

2'-*O*-fukozillaktóz



3-*O*-fukozillaktóz



2. 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. Emellett a 2'-FL képes gátolni számos Enterobacteriaceae törzs növekedését, amelyek hozzájárulnak a bélrendszer gyulladásához és a nektorizáló enterokolitisz (NEC) kialakulásához. 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.

Módszerek

1) A diszacharid építőelemek vizsgálata

Az anyatej minták egészséges önkéntesektől származtak a szülést követő időszakból. Az LNB és LacNAc standardokat részben a Glycom Hungary Kft.-től kaptuk, illetve az Elicityl SA és a Carbosynth Limited cégektől vásároltuk. A HPLC méréseket, valamint a validálást egy Agilent 1100 HPLC rendszeren végeztük. A tömegspektrometriás méréseket egy Agilent 6410B hármas kvadrupól analizátorral és elektroporlasztásos ionizációs (ESI) ionforrással felszerelt készüléken végeztük.

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×g (6000 rpm) mellett egy SIGMA Sartorius 2-16P centrifugával centrifugáltuk. A felső, vizes-metanos fázist összegyűjtöttük, majd az alsó kloroformos fázist és a kicsapott fehérjét elöntöttük. A teljes folyamatot megismételtük a mintaelőkészítés megfelelő hatékonysága érdekében. A mintákat méretkizárásos oszlopkromatográfiának vetettük alá, hogy a nagy mennyiségben jelenlévő laktóztól elválasszuk az anyatejben megtalálható többi szacharidot, valamint, hogy ezen szacharidokat méretük alapján frakcionáljuk. Az LNB/LacNAc alditol formává való redukciójához 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. A redukció lezajlását követően a sókat szilárdfázisú extrakcióval távolítottuk el, amihez egy nem-pórusos grafitizált szén töltetű oszlopot használtunk.

A PGC alapú elválasztáshoz egy Hypercarb (5 µm; 100 x 2,1 mm) oszlopot 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 izokratikus elúciós módszer 3% *B* mozgófázis, 0,5 ml/perces áramlási sebesség és 12 perces analízisidő mellett történt. A retenciós idők megfelelő reprodukálhatósága érdekében minden egyes analízis előtt egy mosási protokollt futtattunk le. Ütköztető gázként nitrogén gázt alkalmaztunk. A tömegspektrumokat pozitív ionizációs módban vettük fel. 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 többcsatornás reakciókövetéssel (MRM) végeztük.

A módszervalidálást az Európai Gyógyszerügynökség (EMA) irányelvei alapján végeztük.

2) Triszacharidok vizsgálata gázkromatográfiával

A 2'-FL és 3-FL standardokat a Glycom A/S cég biztosította számunkra. Az anyatej minták egészséges önkéntesektől származtak a szülést követő időszakból.

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 $3139 \times g$ (6000 rpm) mellett egy SIGMA Sartorius 2-16P centrifugával centrifugáltuk. Az alsó kloroformos fázist és a kicsapott fehérjéket előntöttük, 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 $30\text{ }^\circ\text{C}$ -on, vákuum alatt. Az így kapott mintákat 125 μl 2,5 g/100 ml hidroxilamint tartalmazó piridinben oldottuk, majd 30 percig $70\text{ }^\circ\text{C}$ -on melegítettük. A lehűlt mintákat 225 μl HMDS és 25 μl TFA segítségével trimetilszilileztük 60 percig $100\text{ }^\circ\text{C}$ -on. A lehűlt keveréket egy $0,2\text{ }\mu\text{m}$ RC membrán fecskendőszűrőn átszűrtük.

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

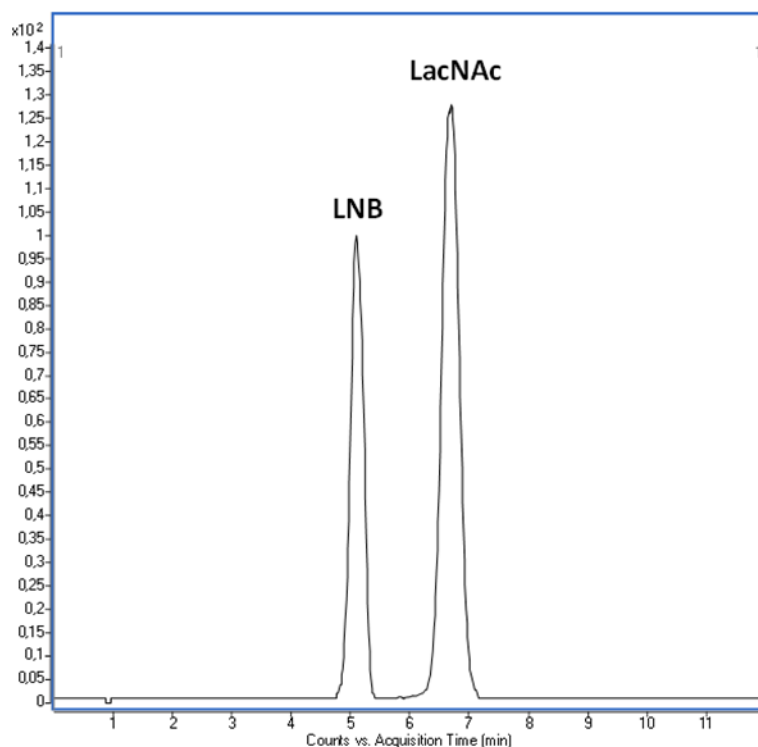
A kvadrupól tömeganalizátorral felszerelt tömegszelektív detektort elektron ionizációs módban üzemeltettük 70 eV mellett. Az azonosításhoz a teljes tömegtartományt felvettük m/z 40-800 között $2\text{ scan}/\text{másodperc}$ frekvenciával. A 2'-FL és 3-FL abszolút kvantifikálásához szelektív ion követést alkalmaztunk, amelyhez mindkét molekula esetében az m/z 204 és 361 fragmentumokat követtük.

A módszervalidálást az Európai Gyógyszerügynökség (EMA) irányelvei alapján végeztük.

Eredmények

1) A diszacharid építőelemek vizsgálata

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



3. 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.

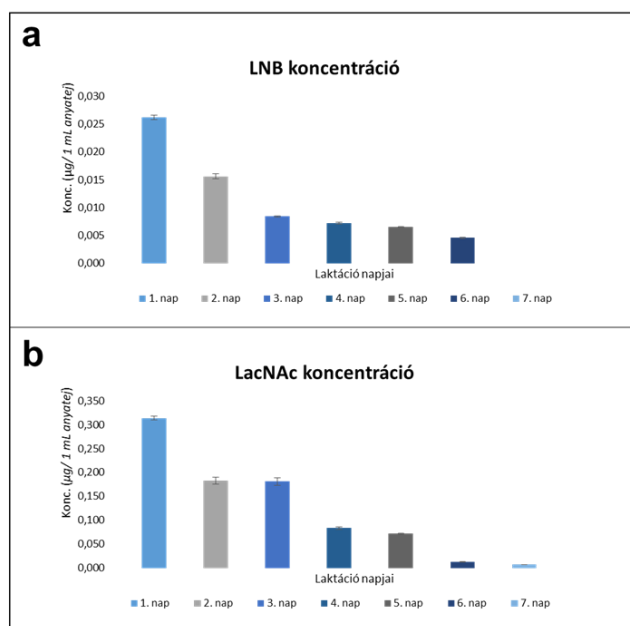
Az Agilent MassHunter Optimizer szoftver segítségével a kvalifikáláshoz és a mennyiségi meghatározáshoz az m/z 228 és m/z 246 fragmenseket választottuk ki mindkét molekula esetében. Szelektív fragmenst egyik molekula esetében sem tudtunk azonosítani.

A validálási eredmények az **1. táblázat**ban kerültek feltüntetésre.

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, 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 (**4. ábra**). A végső koncentrációk a hígításokat figyelembe véve és 1 ml nyers (feldolgozatlan) anyatejre vonatkoznak.

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

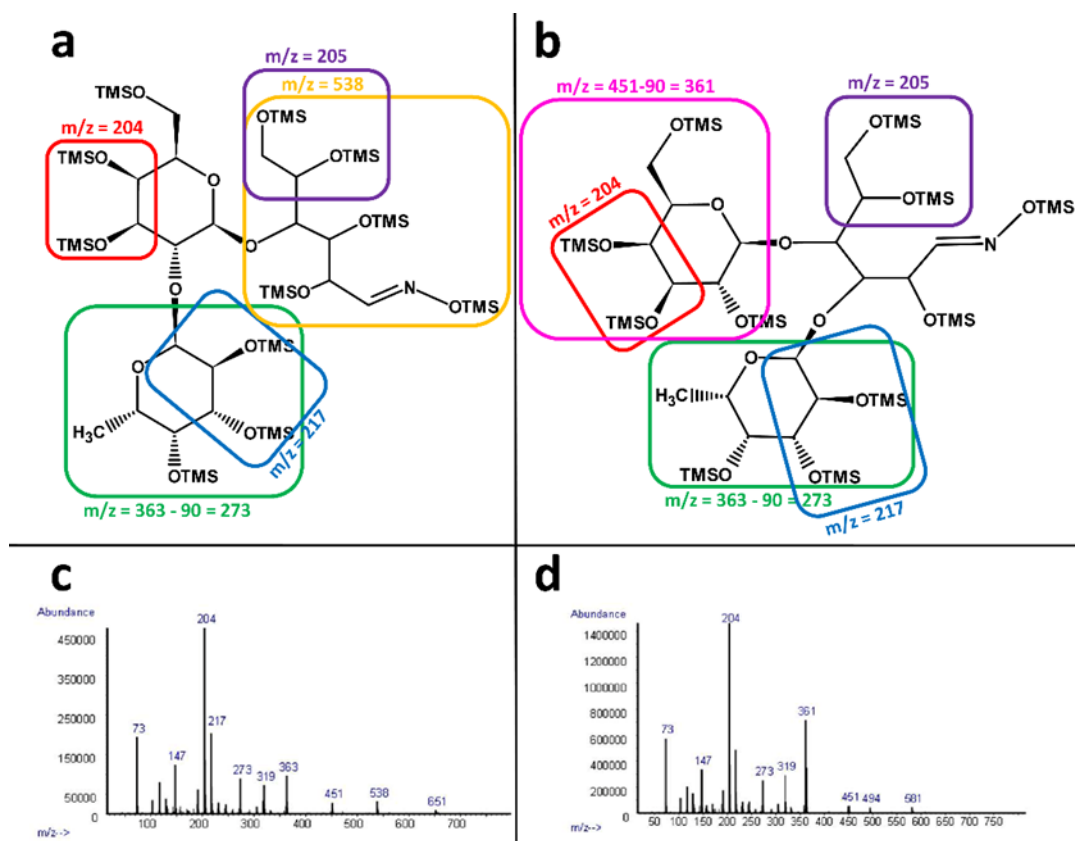
Lakto-N-bióz				N-acetillaktózin				
Pontosság (RSD%) (n=3)								
Csúcs alatti terület					Csúcs alatti terület			
0,03 µg/ml	0,06 µg/ml	0,3 µg/ml	0,9 µg/ml		0,03 µg/ml	0,06 µg/ml	0,3 µg/ml	0,9 µg/ml
2,59	1,42	0,86	0,27	1. nap	1,83	0,92	0,90	0,26
0,59	1,01	0,34	0,47	2. nap	1,36	1,65	0,41	0,50
1,87	1,24	0,62	0,35	Napok közötti (n=6)	1,46	1,53	0,69	0,36
Retenciósi idő					Retenciósi 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	



4. 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.

2) Triszacharidok vizsgálata gázkromatográfiával

A 2'-FL és 3-FL standardok fragmentációs mintázatát vizsgálva (**5. ábra**) 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 segítettek 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.



5. ábra - A 2'-O-fukozillaktóz (a és c) és a 3-O-fukozillaktóz (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 vesztesésre utal.

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

A validálási eredmények a **2. és 3. táblázatban** kerültek feltüntetésre.

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

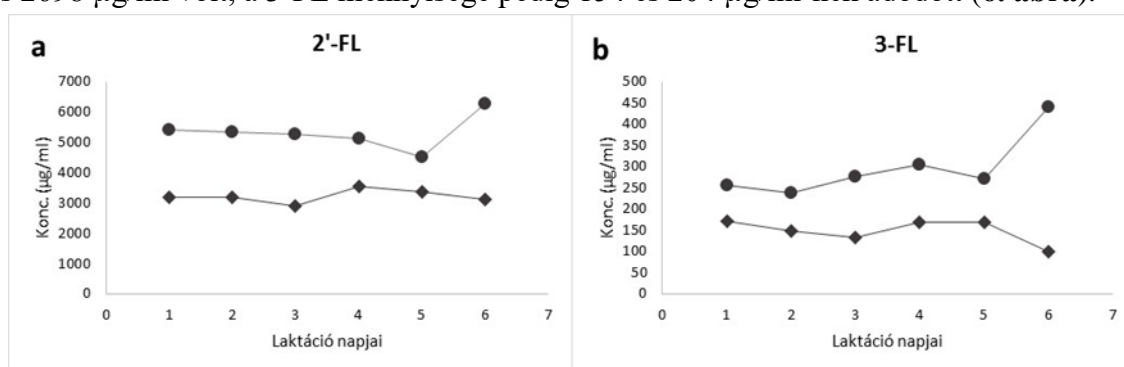
Koncentráció		2'-FL		3-FL	
(µg/ml)		Pontosság	Torzítatlanság	Pontosság	Torzítatlanság
2'-FL	3-FL	(RSD%)	(%)	(RSD%)	(%)
42	2	0,3	6,0	1,3	-3,7
167	17	2,4	3,1	3,2	9,8
333	33	0,7	-1,3	4,8	-3,4

3. 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 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 (**6. ábra**).



6. 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.

Következtetések

1) A diszacharid építőelemek vizsgálata

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. 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.

2) Triszacharidok vizsgálata gázkromatográfiával

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).

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.

Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés alapját képező közlemények

- 1) Qualitative and quantitative analysis of *N*-acetylglucosamine 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. Rác, Sz. Béni, *Gyógyszerészet*, 56(1) (2012) 18-23.

Más témához 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.

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 támogatott. 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 Farmakognóziai 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.