

# Biológiailag aktív vegyületek vizsgálata elválasztástechnikai módszerekkel kapcsolt tömegspektrometriás technikákkal

Doktori értekezés

**Virág Dávid**

Semmelweis Egyetem  
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Ludányi Krisztina, Ph.D., egyetemi docens  
Konzulens: Dr. Klebovich Imre, D.Sc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Kéki Sándor, D.Sc., egyetemi tanár  
Dr. Órfi László, Ph.D., egyetemi tanár

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Zelkó Romána, D.Sc., egyetemi tanár

Tagok: Dr. Vecsernyés Miklós, D.Sc., egyetemi tanár

Dr. Alberti-Dér Ágnes, Ph.D., egyetemi docens

Budapest  
2021

## Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke .....	
1. Bevezetés .....	7
1.1. Biomarkerkutatás .....	7
1.2. Endogén anyagok kvantitatív analízise .....	10
1.2.1. Standard addíció módszere .....	11
1.2.2. Háttérkivonás módszere .....	11
1.2.3. Helyettesítő analit módszere .....	12
1.2.4. Helyettesítő mátrix módszere .....	13
1.2.5. A migrén potenciális biomarkerei .....	14
1.3. Humán $\alpha$ 1-savanyú glikoprotein (AGP) .....	15
1.3.1. Az AGP megváltozott glikozilációja daganatos betegségekben .....	18
1.3.2. A melanoma malignum és biomarkerei .....	19
2. Célkitűzések .....	21
3. Módszerek .....	23
3.1. Anyagok .....	23
3.2. Migrén-biomarkerek meghatározása vérplazmából .....	23
3.2.1. Klinikai minták, standard oldatok, mintaelőkészítés .....	23
3.2.2. RP-HPLC-MS/MS .....	25
3.2.3. Bioanalitikai módszervalidálás .....	25
3.3. Az AGP biomarker jellegének vizsgálata melanomában .....	28
3.3.1. Klinikai minták .....	28
3.3.2. Mintaelőkészítés .....	29
3.3.3. HILIC-MS/MS .....	31
4. Eredmények .....	33
4.1. Migrén-biomarkerek meghatározása vérplazmából .....	33
4.1.1. RP-HPLC-MS/MS .....	33
4.1.2. Bioanalitikai módszervalidálás .....	35
4.1.3. Klinikai minták vizsgálata .....	39
4.2. Az AGP biomarker jellegének vizsgálata melanomában .....	40
4.2.1. HILIC-MS/MS .....	40
4.2.2. Statisztikai analízis .....	49

4.2.3. Az AGP biomarker jellegének értékelése.....	52
5. Megbeszélés.....	55
5.1. Migrén-biomarkerek kvantitatív analízise vérplazmából .....	55
5.2. Az AGP biomarker jellegének vizsgálata melanomában.....	57
6. Következtetések.....	60
7. Összefoglalás .....	62
8. Summary.....	63
Irodalomjegyzék .....	64
Saját publikációk jegyzéke .....	76
Köszönetnyilvánítás.....	78

**Rövidítések jegyzéke**

<b>Rövidítés</b>	<b>Magyar megfelelő</b>	<b>Angol megfelelő</b>
5-HT	5-hidroxitriptamin (szerotonin)	5-hydroxytryptamine (serotonin)
ACN	Acetonitril	Acetonitrile
AGP	$\alpha$ 1-savanyú glikoprotein	$\alpha$ 1-acid glycoprotein
AJCC	Amerikai Rákellenes Vegyes Bizottság	American Joint Committee on Cancer
$\beta$ ME	$\beta$ -merkaptoetanol	$\beta$ -mercaptoethanol
BSA	Marha szérum albumin	Bovine serum albumin
BST	Belső standard	Internal standard
CID	Ütközés gerjesztett disszociáció	Collision induced dissociation
DNS	Dezoxiribonukleinsav	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Etilén-diamin-tetraecetsav	Ethylenediaminetetraacetic acid
EMA	Európai Gyógyszerügynökség	European Medicines Agency
F	Fisher index	Fisher index
F	Fukóz	Fucose
FA	Hangyasav	Formic acid
FDA	Élelmiszer- és Gyógyszerfelügyelet	Food and Drug Administration
G	Galaktóz	Galactose
H	Hexóz	Hexose

HILIC	Hidrofil kölcsönhatású folyadékkromatográfia	Hydrophilic interaction liquid chromatography
HPLC	Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia	High performance liquid chromatography
HSA	Humán szérum albumin	Human serum albumin
ICH	Nemzetközi Egységesítési Konferencia	International Conference on Harmonization
LAT	L-típusú aminosav transzporter	L-type amino acid transporter
LC-MS	Folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria	Liquid chromatography coupled to mass spectrometry
LDA	Lineáris diszkriminancia analízis	Linear discriminant analysis
LDH	Laktát dehidrogenáz	Lactate dehydrogenase
LLOQ	Kvantitálás alsó határa	Lower limit of quantitation
LNAA	Nagy neutrális aminosav	Large neutral amino acid
M	Mannóz	Mannose
MALDI	Mátrix segített lézer deszorpció/ionizáció	Matrix assisted laser desorption/ionization
MITF	Mikroftalmia-asszociált transzkripció faktor	Microphthalmia-associated transcription factor
<i>m/z</i>	Tömeg/töltés arány	Mass to charge ratio
NMM	Noduláris malignus melanoma	Nodular malignant melanoma
MQ	MilliQ (víz)	MilliQ (water)
MRM	Többszörös reakció megfigyelés	Multiple reaction monitoring
MS	Tömegspektrometria	Mass spectrometry
N	N-acetil-glükózamin	N-acetylglucosamine

NAP	Nemzeti Agykutatósi Program	Hungarian Brain Research Program
ORM	Orozomukoid	Orosomuroid
PBS	Foszfát pufferes sóoldat	Phosphate buffered saline
PNGáz F	Peptid: <i>N</i> -glikozidáz F enzim	Peptide: <i>N</i> -glycosidase F enzyme
QC	Minőségellenőrzés	Quality control
RE	Relatív hiba	Relative error
RF	Válaszfaktor	Response factor
RNS	Ribonukleinsav	Ribonucleic acid
RPM	Percenkénti fordulatszám	Revolutions per minute
RSD	Relatív standard deviáció	Relative standard deviation
S	Sziálsav	Sialic acid
SDS	Nátrium-dodecil-szulfát	Sodium dodecyl sulfate
SSM	Szuperficiálisan terjedő malignus melanoma	Superficially spreading malignant melanoma
TFA	Trifluorecetsav	Trifluoroacetic acid
TNM	Tumor, csomó, metasztázis klasszifikációs rendszer	Tumor, node, metastasis classification system
TOF	Repülési idő analizátor	Time of flight analyzer
ULOQ	Kvantitálás felső határa	Upper limit of quantitation
UV	Ultraibolya	Ultraviolet
ZIC-HILIC	Zwitterionos hidrofil kölcsönhatású folyadékromatográfia	Zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography

## 1. Bevezetés

### 1.1. Biomarkerkutatás

Az amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerfelügyelet (*Food and Drug Administration*, FDA) definíciója alapján a biomarker egy meghatározott jellegzetesség, melynek mérésével jelezhető valamilyen fiziológiás vagy patológiás folyamat, illetve valamilyen expozícióra adott válasz, beleértve a terápiás beavatkozásokat [1]. Megkülönböztetünk molekuláris, szövettani, radiográfiás és fiziológiás biomarkereket [2,3]. A molekuláris biomarkerek valamely fizikai-kémiai tulajdonságuk alapján minőségileg vagy mennyiségileg mérhetők biológiai eredetű mintákban (pl. vércukorszint meghatározása). A szövettani biomarkerek sejtek, szövetek vagy testnedvek molekuláris, illetve biokémiai változásaira reflektálnak (pl. daganatok stádiummeghatározása szövettani metszetek alapján). A radiográfiás markerek képalkotó technikákkal történő meghatározáson alapulnak (pl. csontsűrűség mérése oszteodenzitometriával). A fiziológiás biomarkerek az előző kategóriákba nem sorolható egyéb testi folyamatot jeleznek (pl. vérnyomásmérés). Felhasználási területük is igen szerteágazó, megkülönböztetünk diagnosztikus, prognosztikus és szűrési célú biomarkereket, de alkalmazhatók előrejelzésre, rizikófaktorok azonosítására, illetve terápia hatásosságának és biztonságosságának nyomonkövetésére [4].

Az utóbbi két évtizedben jelentősen megnőtt az igény új, főként molekuláris biomarkerek azonosítására. Ennek egyik fontos oka, hogy új, a gyógyszerek klinikai kipróbálása során egyre inkább elterjed a helyettesítő végpontok (markerek) alkalmazása. A jól megválasztott helyettesítő végpont szoros összefüggésben van a terápia valódi sikerét bizonyító, kemény klinikai végponttal, de annál lényegesen korábban értékelhető, nagymértékben gyorsítva olyan készítmények befogadását, melyek életet menthetnek, vagy nyújthatnak meg (pl. daganatterápiás szerek) [3,5,6]. A biomarkerek iránt megnőtt érdeklődés másik fontos tényezője, hogy a bioinformatika és bioanalitika drámai fejlődésen ment keresztül az utóbbi évtizedekben. Ez különösen igaz a tömegspektrometria (MS) alapú technikákra, amelyek minden eddiginél nagyobb érzékenységgel és specificitással biztosítanak lehetőséget a potenciális biomarkerek azonosítására, kvantitatív meghatározására és szerkezetfelderítésére nagy átérzékenységgel mellett. Ezzel párhuzamosan a technika egyre inkább

felhasználóbaráttá és elérhetővé válik a kutatók széles körének, elősegítve az ilyen irányú kutatások fejlődését és elterjedését [7].

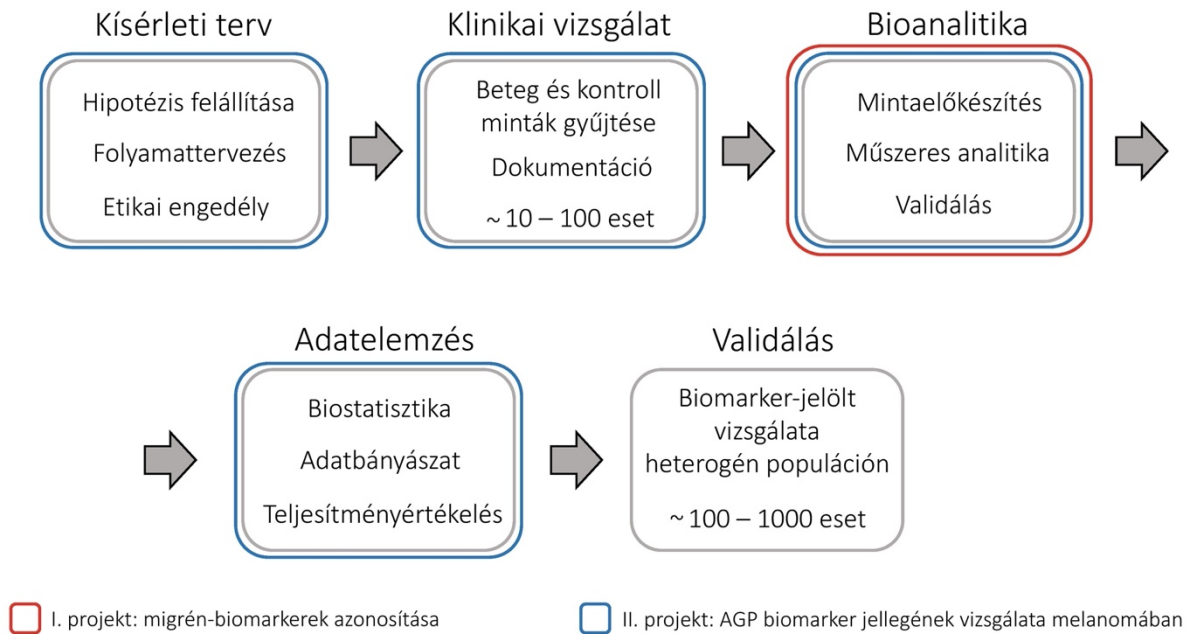
Mindezek ellenére elterjedt nézet, hogy a biomarker-felfedezés a biológiai kutatások egyik legösszetettebb, legnehezebben megvalósítható válfaja. Ez egyrészt a biológiai rendszerek komplexitásából, az egyéni különbségekből, illetve abból adódik, hogy a betegségek patomechanizmusai általában igen összetettek, ezért a szervezetben fennálló számos egyéb fiziológiás vagy kóros állapot interferálhat a folyamattal molekuláris szinten, nehezítve a biomarker azonosítását, és megkérdőjelezve annak valódi hasznosságát [7]. Másrészt az ilyen irányú kutatások multidiszciplináris szemléletmódot és számos terület magasszintű ismeretét feltételezik, mint a betegség kórlejtana és biokémiája, a meghatározni kívánt molekulák bioanalitikája, valamint a biostatistika/bioinformatika. Ez alapján törvényszerű, hogy a feladatok szerteágazó mivoltából adódóan az eredményes biomarkerkutatás egy kutatócsoport keretein belül tud megvalósulni, melynek tagjai között nélkülözhetetlen a szoros együttműködés és a jó kommunikáció [8].

Bár az új biomarkerek felfedezésére különböző megközelítések léteznek, a szakirodalom általában öt fő fázisra osztja a folyamatot [9]. A kutatás kezdeti lépése a kísérleti terv felállítása. Ez magában foglalja a kiindulási hipotézis megfogalmazását a kórfolyamat biokémiai hátterének ismeretében. Ebben a lépésben kerül meghatározásra a biomarker-jelölt molekulák köre, a vizsgálni kívánt esetek klinikai jellemzése, valamint a biológiai minta típusának és szükséges mennyiségének meghatározása. Tekintve, hogy az esetek legnagyobb részében a biomarker-kutatás nem valósítható meg beteg és egészséges kontroll egyének bevonása nélkül, ebben a fázisban kell beszerezni a vizsgálatokhoz szükséges etikai engedélyeket. A folyamat második lépése a klinikai vizsgálatok tervezése, megszervezése és lebonyolítása. Ebben a fázisban különös hangsúlyt kell fektetni a biológiai minta gyűjtésének és tárolásának körülményeire, illetve azok dokumentálására. Az esetszám általában néhány tíz, de elérheti a százas nagyságrendet is [9]. A kutatás harmadik szakasza a biológiai minták vizsgálata, melybe beletartozik a mintaelőkészítési és bioanalitikai módszerek fejlesztése, alkalmazása, továbbá kvantitatív meghatározás esetén az analitikai módszer validálása. A klinikai vizsgálatok és a műszeres analitikai mérések során összegyűlt adatok elemzése alkotja a folyamat negyedik fázisát. Ez általában biostatisztikai/kemometriai módszerek



alkalmazásával valósul meg, de nem ritkán a statisztikus számára kezelhetetlen mennyiségű adat keletkezik, melyet különböző „adatbányászati” technikákkal lehet átláthatóvá tenni [10]. Ebben a szakaszban történik a biomarker-jelölt(ek) teljesítményértékelése, ezért ez a fázis fontos döntési pontként szolgál a kutatás további kimenetele szempontjából. A folyamat utolsó lépésében a jól teljesítő biomarkerjelölt validálása történik egy átfogó klinikai kutatás keretében, mely arra keresi a választ, hogy a marker nagyobb és változatosabb populációban is alkalmas annak a kérdésnek a megválaszolására, amelyre fejlesztették. A klinikai validálás általában százas nagyságrendű mintaszámot igényel, de bizonyos esetekben elérheti az ezret is [9]. Annak ellenére, hogy a biomarker-felfedezést a fent említett módon fázisokra szokás osztani, érdemes ezekre nem konzekutív, hanem egymással bizonyos mértékig átfedő, párhuzamos lépések folyamataként tekinteni, ahol visszacsatolás is megvalósulhat az egyes szakaszok között.

Jelen munka két, egymástól független, a molekuláris biomarker-felfedezés koncepciója mentén mégis egységet képező kutatási projektet mutat be, melyet a Semmelweis Egyetem Gyógyszerészeti Intézet Bioanalitikai és Kémiai Ellenőrző Laboratórium kutatócsoportjában végeztem, Dr. Ludányi Krisztina témavezetésével. Kutatócsoportunk eltérő szerepet töltött be a két projektben, amelyre reflektál a dolgozat terjedelmi megoszlása is. Az első projekt a migrén patomechanizmusában potenciálisan szerepet játszó kismolekulás markerek azonosítására irányult, melybe neurotranszmitterek, aminosavak és azok anyagcseretermékei tartoznak. Az említett felosztás szerint kutatócsoportunk a folyamat harmadik fázisában vett részt, tehát feladatunk a mintaelőkészítési és műszeres analitikai módszerek fejlesztése és validálása, továbbá az anyagok meghatározása volt, közel ezer vérplazma mintából. A második munkában egy szérumfehérje, a humán  $\alpha$ 1-savanyú glikoprotein (AGP) biomarker jellegét vizsgáltuk malignus melanomában. A projekt kutatócsoportunk kezdeményezésére indult, és aktívan közreműködött a folyamat valamennyi – eddig lezajlott – szakaszában, beleértve a kísérleti terv felállítását és az etikai engedélyek beszerzését, a klinikai vizsgálatok tervezését és lebonyolítását, a bioanalitikai módszerek fejlesztését és alkalmazását, továbbá az adatok kiértékelését. Az **1. ábra** bemutatja a biomarker-felfedezés szakaszait, illetve kutatócsoportunk részvételét a két projekt fázisaiban.



**1. ábra** A biomarkerkutatás folyamata és kutatócsoportunk szerepvállalása a két bemutatásra kerülő kutatási projektben

## 1.2. Endogén anyagok kvantitatív analízise

Egy tipikus bioanalitikai módszervalidálás során a kalibráló egyenes szerkesztéséhez szükséges, illetve a minőségellenőrző (*Quality Control*, QC) minták készítéséhez a vizsgálati mintákkal azonos természetű, de a mérendő komponensekre nézve üres, *blank* biológiai mátrixhoz adjuk hozzá az analit és a belső standard (BST) ismert mennyiségét. Ezzel biztosítjuk, hogy a vizsgálati és a validálási minták hasonló környezetet jelentenek az analit és a BST számára. Így a mintaelőkészítés során potenciálisan fellépő anyagvesztés egyformán érinti a mintákat, tehát megegyezik az extrakciós hatások. Tekintve, hogy a bioanalitikai méréseket főként folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriával (LC-MS) végzik, a biológiai közeg megegyezősége azt is garantálja, hogy a mátrixhatás mértéke is azonos a mérendő komponensek és a belső standardok számára. Az elmúlt időszakban azonban egyre nagyobb igény jelentkezik endogén anyagok biológiai mátrixban történő kvantitatív meghatározására. Ennek fő okai, hogy számos vegyület képezi biomarkerkutatások tárgyát, illetve számos gyógyszerként alkalmazott vegyület egyben endogén anyag is. Ilyen esetekben viszont nem áll rendelkezésre *blank* mátrix, nehezítve a kvantitatív

meghatározást és a módszervalidálást [11]. Az Európai Gyógyszerügynökség (*European Medicines Agency*, EMA), valamint az FDA vonatkozó irányelvei csak a xenobiotikumok (és azok metabolitjainak) kvantitatív bioanalízisét, illetve módszervalidálását szabályozza [12,13]. Az anyagok endogén eredetéből adódó nehézségek leküzdése érdekében, egyre inkább elterjednek az ún. „*fit for purpose*” (a célnak megfelelő) kvantitálási/validálási stratégiák. A szakirodalom négy megközelítést különböztet meg: a standard addíció (*standard addition*), a háttérkivonás (*background subtraction*), a helyettesítő analit (*surrogate analyte in authentic matrix*), valamint a helyettesítő mátrix (*authentic analyte in surrogate matrix*) módszerét [14–20].

#### 1.2.1. Standard addíció módszere

A standard addíciós módszer alkalmazása során a vizsgálati mintát több egyenlő részre osztjuk. Egyet leszámítva, a részletekhez növekvő koncentrációjú standard analitoldatot és azonos mennyiségű BST-t adunk (*spikeoljuk* a mintát). A mintarészletek mérésével generált analitikai jelet ábrázolva a hozzáadott analitkoncentráció függvényében, egyenest kapunk, melynek negatív x tengely metszete megadja a minta endogén analitkoncentrációját [21]. Standard addíciónál tehát különálló kalibráló egyenest veszünk fel minden vizsgálati mintára, lehetővé téve az endogén koncentráció direkt meghatározását. A módszer vitathatatlan előnye, hogy a mátrixhatásból adódó potenciális mérési hibát teljes mértékben kiküszöböli, tekintve, hogy a meghatározás teljes folyamata ugyanabban a (vizsgálati) mintában valósul meg, így még az azonos típusú, de különböző eredetű mátrixból adódó eltérések sem okoznak mérési hibát (pl. ugyanazon betegről eltérő napszakban gyűjtött szérum). A módszer hátránya a nagy mintaigény, továbbá egyetlen mérési eredményhez több (általában öt) mintaelőkészítést és mérést kell elvégezni, emiatt nagyon költséges és munkaigényes. Így a standard addíció alkalmazása erősen korlátozott, ha az egyéni mintákból kis mennyiség áll a rendelkezésre, vagy ha a cél nagyszámú minta meghatározása [20].

#### 1.2.2. Háttérkivonás módszere

A standard addícióhoz hasonlóan, háttérkivonásnál szintén növekvő mennyiségű analitot adunk egy részletekre osztott mintához. Ezt azonban csak egyetlen (reprezentatív) mintán végezzük el, melyből meghatározzuk a mátrix bazális analitkoncentrációját. Az értéket kivonjuk a *spikeolt* minták koncentrációjából, és ezekre

a korrigált értékekre illesztünk kalibráló egyenest, a továbbiakban ezt alkalmazva az egyéni minták meghatározására [20]. A módszer előnye tehát, hogy a kalibráló egyenes a vizsgálati mintákkal azonos típusú mátrixban vehető fel, és a folyamatot nem kell minden egyéni minta esetén ismételni. Hátránya, hogy a kvantálás alsó határa (*lower limit of quantitation*, LLOQ) nem határozható meg kísérleti úton, és nagyban függ a reprezentatív minta háttérkoncentrációjától. Abban az esetben, ha a kalibrációhoz alkalmazott mátrixnál várható alacsonyabb koncentrációjú minta (pl. egy olyan betegség vizsgálatában, ahol az analit alulexpresszálódik), lehetőség van a minta hígítására, ekkor azonban figyelembe kell venni a közeg összetételének változását, mely eltérő extrakciós hatásfokot és mátrixhatást eredményezhet. A módszer másik hátránya, hogy a kalibráló minta eltérő háttérkoncentrációja miatt, alacsony a módszer laborok közti reprodukálhatósága [20,22,23].

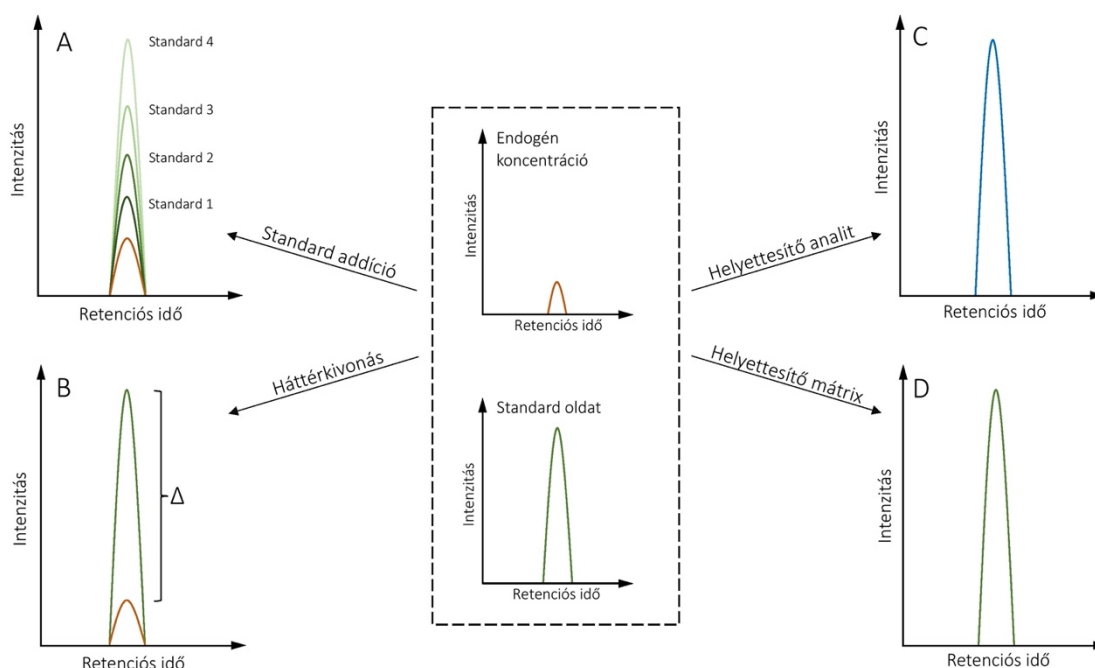
### 1.2.3. Helyettesítő analit módszere

A helyettesítő analit módszer során, a mérendő komponens stabilizotóp-jelzett standardját alkalmazzuk a kalibrációs egyenes felvételénél. Mivel a jelzett standardra nézve a biológiai mátrix üres, az valódi *blank*nek tekinthető [20,24,25]. A módszer azzal a feltételezéssel él, hogy a molekulatömegét leszámítva, a jelzett analóg minden fizikai-kémiai tulajdonságában megegyezik az analittal (vagy csak minimálisan tér el attól), és hasonlóan viselkedik ahhoz retenciós idő, extrakciós hatásfok, mátrixhatás és detektor válaszjel szempontjából. Utóbbi gyakran nem teljesül, mely az analógok eltérő ionizációs hatásfokából adódik. Ilyenkor meg kell határozni a jelzett és a nem jelzett analit válaszjelének arányát (*response factor*, RF). Ha RF nem egyenlő eggyel, de értéke állandó a teljes kalibrációs tartományban, akkor a jelzett standard alkalmazható, de RF értékével korrigálni kell a kvantitatív mérések eredményét. További kritérium, hogy az izotóp-jelzett standard monoizotópos tömegének legalább annyival meg kell haladnia az analitét, hogy ne mutasson átfedést annak természetesen előforduló <sup>13</sup>C izotópjaival [26]. A módszer legnagyobb előnye, hogy megfelelő helyettesítő analit választása esetén a mérések lebonyolítása és a validálás kivitelezhető az EMA és FDA irányelveinek megfelelően. Hátránya, hogy minden mérendő komponensre két stabilizotóp-jelzett standarddal kell rendelkezni (egy helyettesítő analitként, egy pedig BST-ként szolgál) [11]. Ez egyrészt rendkívül költségessé teszi az eljárást, különösen nagyszámú mérendő

komponens esetén, másrésről nagymértékben limitálja a módszer alkalmazhatóságát, mivel számos anyagból nem áll rendelkezésre két különböző izotópjelzett standard.

#### 1.2.4. Helyettesítő mátrix módszere

A helyettesítő mátrix módszerénél a vizsgálati minták biológiai közege helyett valamilyen egyéb közeget használunk a kalibráló (és QC) minták elkészítéséhez. Helyettesítő mátrixként alkalmazhatunk egyszerű oldatokat, mesterséges mátrixot, vagy kezelt mátrixot, mely a biológiai közeg analitmentesített változatát jelenti [27–32]. Egyszerű oldatok általában akkor jöhetnek szóba, ha az oldat és a biológiai mátrix összemérhető extrakciós hatások és mátrixhatás szempontjából (jellemzően az előbbi magas, utóbbi pedig elhanyagolható). Ha ismert a biológiai közeg összetétele, megkísérélhető mesterséges úton való előállítás, melynek célja, hogy a lehető legjobban szimulálja a biológiai mintát, különösen az analitok oldhatósága, a pH és ionerősség szempontjából. Vércserum és plazmaminták szimulálására éppen azért gyakran alkalmazzák a foszfát pufferes sóoldatot (*phosphate buffered saline*, PBS), melyhez 2–8% marha (BSA), vagy humán szérum albumint (HSA) adagolnak [20]. De mesterséges mátrix előállítható vizelet, könny, nyál, cerebrospinalis folyadék és hüvelyváladék helyettesítésére is [30,33–36]. A kezelt mátrixok előállítását nagymértékben befolyásolja az analit tulajdonsága. Bomlékony vagy hőérzékeny vegyületek esetén (pl. aszkorbinsav) elegendő a mátrix szobahőmérsékleten történő tárolása, vagy enyhe melegítése [37]. Az analitmentesítés azonban legtöbbször aktív szén kezeléssel történik. Ebben az esetben nagy gondot kell fordítani az aktív szén eltávolítására a kezelést követően, máskülönben a standard hozzáadása után is kifejtheti hatását, befolyásolva a mérési eredményket. Az aktív szénrel történő analitmentesítést limitálja, hogy számos anyag nem, vagy nem teljes mértékben távolítható el így a közegből. További hátránya, hogy drasztikusan megváltoztatja a mátrix összetételét, és reprodukálhatósága is csekély [20]. Akármelyik megközelítést is követjük, a helyettesítő mátrix módszer előnye, hogy nagyszámú minta, és sok analit egymás melletti meghatározására is alkalmas. Hátránya viszont, hogy a jól megválasztott helyettesítő mátrix is csak bizonyos mértékig reprezentálja a biológiai mintát, ezért közegek közti párhuzamosságot (parallelizmust) értékelni kell, mellyel részletesen foglalkozik az értekezés 3.2.3. és 4.1.2. fejezete. A *fit for purpose* stratégiákat a 2. ábra foglalja össze.



**2. ábra** A *fit for purpose* kvantitálási/validálási stratégiák sematikus ábrázolása [20]

*Standard addíció (A)* esetén a vizsgálati minta részleteihez adott különböző koncentrációjú standard oldatok segítségével határozzuk meg az endogén analitkoncentrációt. *Háttérkivonásnál (B)* egy reprezentatív minta endogén koncentrációjának kivonását követően alkotunk kalibráló egyenest. *A helyettesítő analit módszerénél (C)* a mérendő komponens stabilizotóp jelzett változatát alkalmazzuk a kalibráció elkészítéséhez. *A helyettesítő mátrix módszer (D)* esetén analitmentesített vagy mesterséges mátrixban készítünk kalibrációt.

### 1.2.5. A migrén potenciális biomarkerei

A migrén egy elsődleges fejfájási rendellenesség, melynek globális prevalenciája 15-18% [38]. A betegség jellemzően lüktető, általában féloldali, moderált vagy erős fájdalommal jár, melyet gyakran kísér hányinger vagy hányás, hang- és fényérzékenység, és a tünetek általában erősödnek fizikai aktivitás hatására [39]. Embereken és állatokon végzett kutatások eredményei alátámasztják, hogy az agy és a vérplazma krónikusan alacsony interiktális (a rohamok közötti időszakban mérhető) szerotonin szintje összefüggésbe hozható a trigeminovaskuláris rendszer fokozott érzékenységgel, mely hozzájárulhat az ismételt migrénes rohamok kialakulásához [38,40–42]. Összhangban a szerotonerg diszfunkció elméletével, az 5-HT<sub>1B/1D</sub> (az 5-hidroxitriptamin receptor 1B és 1D altípusa) agonista triptánok enyhítik a migrén tüneteit, míg a triptofán-kimerülés – mely hatására gyorsan csökken az agy szerotonin koncentrációja – fokozza az agy excitabilitását és a migrénes tünetek erősségét [40,42,43]. Az agy szerotoninszintjét

azonban nem kizárólag a triptofán, hanem más nagy, neutrális aminosavak (*large neutral amino acid*, LNAA) vérplazma koncentrációja is befolyásolja, melyek versengenek a vér-agy gát L-típusú aminosav transzporterének (*L-type amino acid transporter*, LAT1) elfoglalásáért. Az LNAA-k közé tartozik a valin, a leucin, az izoleucin, a fenilalanin és a tirozin. Fernstrom definiálta a triptofán-LNAA plazmakoncentrációjának hányadosát, mely kísérleti adatokkal alátámaszthatóan befolyásolja az agy triptofán koncentrációját, és a szerotoninszintézist [44]. A triptofán-LNAA arány étrendi befolyásolása bizonyítottan képes viselkedésbeli változások kiváltására a szerotonerg neurotranszmisszió befolyásolásával (bár a pontos mechanizmus nem ismert), pl. triptofán-mentes aminosavkeverék fogyasztása akután képes fokozni a szorongást, és hangulatromlást okozni [43–45]. Hasonlóan, a triptofánhiány képes súlyosbítani a migrénes rohamokat, az arra hajlamos egyéneknél. A triptofán másik fontos anyagcsereterméke a kinurenin, mely előanyaga a kinurénsavnak. Utóbbi excitatorikus receptorok ligandja, és neuroprotektív hatással bír. A szerotonerg és glutamáterg neurotranszmisszió befolyásolása révén szerepet játszik a migrén patomechanizmusában. Ezzel összhangban, krónikus migrénes betegek vérében a kinurénsav csökkent koncentrációja figyelhető meg, továbbá számos kutatás irányul a kinurénsav-analógok migréngyógyszerként történő alkalmazására [46].

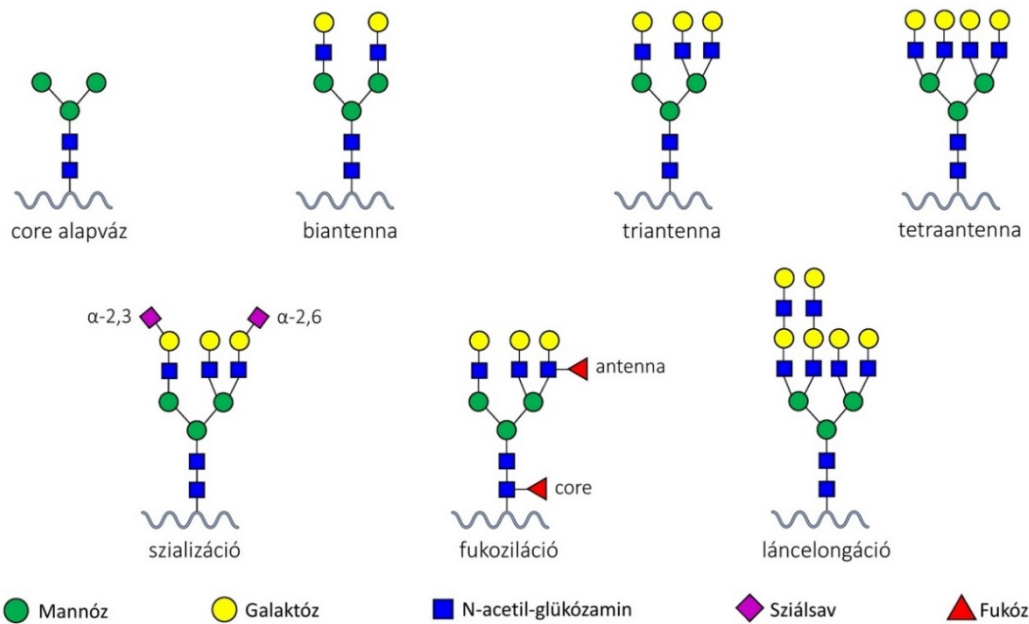
### 1.3. Humán $\alpha$ 1-savanyú glikoprotein (AGP)

A humán  $\alpha$ 1-savanyú glikoprotein, másnéven orozomukoid (ORM) egy 41-43 kDa közötti molekulatömegű pozitív akutfázis fehérje [47]. A 183 aminosavból álló peptidet három gén kódolja (ORM-A, ORM-B, ORM-B') melyek a IX. kromoszóma hosszú karján helyezkednek el. Az ORM-A gén kódolja az ORM1 fehérjét, mely szérum-AGP 75%-át alkotja, az ORM-B és ORM-B' pedig ugyanazt az ORM2 fehérjét kódolják. A két genetikai variáns 22 aminosavban különbözik egymástól. Az ORM1 esetén különbség lehet további két aminosavban, melyek három variánst eredményeznek (ORM1\*F1, ORM1\*F2, ORM1\*S) [48,49]. Az AGP-t főként a májsejtek termelik, de megfigyelték extrahepatikus expresszióját is, többek között a prosztatában, fehérvérsejtekben és különböző daganatszövetekben [50–54]. A peptidlánc 15-ös, 38-as, 54-es, 75-ös és 85-ös pozícióiban található aszparagin aminosavakhoz poszt-transzlációs módosításként oligoszacharid oldalláncok kapcsolódnak. Az AGP tehát egy N-glikozilált fehérje, mely molekulatömegének mintegy 45%-át szénhidrátok alkotják [47]. Az

oligoszacharidok öt különböző monoszacharid egységből épülhetnek fel, melyek a mannóz (Man, M), galaktóz (Gal, G), N-acetil-glükózamin (GlcNAc, N), N-acetil-neuraminsav vagy szialsav (NeuAc, S) és a fukóz (Fuc, F). Az AGP oligoszacharidjai komplex szerkezetűek, mely a következő szerkezeti sajátosságokat takarja (**3. ábra**):

- a lánc egy ún. *core* (mag) szerkezettel kapcsolódik a peptidlánchoz, mely két N-acetil-glükózaminból és három mannózból álló konzervatív szerkezet.
- A két láncvégi mannózhoz kettő, három vagy négy N-acetil-glükózamin kapcsolódik, mely meghatározza, hogy hány elágazást tartalmaz a szénhidrát. Ez alapján megkülönböztetünk bi-, tri-, és tetraantennás szerkezeteket.
- Az N-acetil-glükózamin egységekhez minden esetben kapcsolódik egy galaktóz is.
- Az elágazások számától függetlenül, egy vagy több galaktózegységhez mindig kapcsolódik szialsav, ezért az AGP-t szokás szialoglikoproteinnek is nevezni.
- A szialsav két módon,  $\alpha$ -2,3 vagy  $\alpha$ -2,6 kötéssel kapcsolódhat a galaktózhoz.
- Az oligoszacharid lánc egy vagy több fukózt is tartalmazhat, bár jelenlétük nem törvényszerű az AGP esetén. A fukózegységek jellemzően a fehérjelánchoz legközelebb eső (*core* fukoziláció) és/vagy az elágazó részben található N-acetil-glükózaminhoz (antenna fukoziláció) kapcsolódhatnak.
- Gyakori megfigyelés továbbá az is, hogy a láncvégi galaktózhoz nem önmagában áll, vagy szialsavat hordoz, hanem egy N-acetil-glükózaminból és galaktózból álló lánchosszabbodást (elongációt) tartalmaz.





3. ábra Az AGP oligoszacharid oldalláncainak szerkezeti sajátosságai

Ezek a strukturális sajátosságok rendkívül nagy variációs lehetőséget biztosítanak az AGP glikozilációs szerkezetében, a molekulára ún. mikroheterogenitás jellemző. A glikoziláció helyspecifikus vizsgálataival megfigyelték hogy a peptidlánchoz bizonyos törvényszerűségek alapján kapcsolódnak az oligoszacharidok: a 15-ös pozícióban nem fordul elő tetraantennás szerkezet, a 38-as pozícióban nincs fukozilált glikán, az 75-ös pozícióban nincs biantennás lánc, továbbá csak a 75-ös és 85-ös pozícióban található többszörösen fukozilált szerkezet [55].

Bár az AGP szerepét számos, a szervezetben lezajló folyamattal hozták összefüggésbe, eddig két fő biológiai funkcióját azonosították. Mint a lipokalin család képviselője, kis hidrofób molekulák transzportját végzi [56]. A lipokalin családon belül az ún. immunokalinok közé tartozik, melyek gyulladási folyamatok immunmodulációjában is szerepet játszanak [57]. Tekintve, hogy az AGP egy pozitív akutfázis fehérje, hepatikus túlexpressziója figyelhető meg különböző traumákra adott szisztémás gyulladási reakciókban (pl. fizikai trauma, sebesülés, bakteriális fertőzések) [58]. Ezenfelül számos daganatos megbetegedésben is az AGP emelkedett szérumszintjét figyelték meg, mint a tüdőrák, húgyhólyag daganatok, veserák, petefészek rák, mellhártyarák, illetve számos hematológiai és gasztrointesztinális rendszeri daganat [59].

### 1.3.1. Az AGP megváltozott glikozilációja daganatos betegségekben

A fehérjék (polipeptidek) és nukleinsavak bioszintézisével ellentétben, az oligo- és poliszacharidok képződése nem templát-mediált folyamat [60]. A kialakuló cukorláncok szerkezete nagymértékben függ a felépítésükért felelős glikotranszferáz és glikozidáz enzimek arányától, és a láncot felépítő monoszacharid egységek mennyiségétől. A szacharidok szintéziséről, így a fehérjék cukorláncokkal történő poszt-transzlációs módosításáról, vagyis a glikozilációról kijelenthető, hogy mikrokörnyezet-függő folyamat [61]. Az így kialakuló glikoproteineket pedig nagyfokú heterogenitás jellemzi [62]. Daganatos sejtekben több glikoziláció-specifikus gén megváltozott expresszióját, és így a normálistól eltérő glikoproteinek megjelenését figyelték meg [61]. Ezek szerepét eddig a sejtszignalizációban, a tumorprogresszióban, valamint a metasztázis folyamatában igazolták [63–67]. Ennek ellenére a terület továbbra is meglehetősen felfedezetlennek minősül.

Az AGP a glikoziláción alapuló biomarkerkutatások gyakori modellvegyülete. Erre részben viszonylagosan magas szérumkoncentrációja teszi alkalmassá (0,5-1 mg/ml), mely malignus folyamatokban még tovább emelkedhet, és ezt elsősorban nem a hepatikus túlexpressziójával, hanem a daganat saját AGP termelő képességével magyarázzák [68]. Alkalmassá teszi továbbá a molekula összetett glikozilációs mintázata, mely számos lehetőséget nyújt a kórfolyamatok hatására bekövetkező változások azonosítására. Tekintettel a magas koncentrációra és a molekula jelentős cukortartalmára, érzékeny analitikai módszerek alkalmazásával megvalósítható - az arányukat tekintve meglehetősen kis mennyiségben jelenlevő – glikán szubfrakciók nyomonkövetése is. Bár a molekula malignus folyamatokban betöltött szerepe nem tisztázott, a különböző daganatos szövetek nyújtotta eltérő mikrokörnyezet feltételezhetően az AGP eltérő glikozilációját eredményezi, megnyitva a lehetőséget specifikus biomarkerek azonosítására [61]. Bár az AGP glikánszerkezetének vizsgálatára irányuló kutatások módszertana meglehetősen különböző, jellemzően három tulajdonság megváltozásáról számolnak be: a szializáltság és fukoziláltság mértékének megváltozása, továbbá az elágazások számának növekedése (több elágazást tartalmazó szerkezetek felszaporodása) [69–72].

### 1.3.2. A melanoma malignum és biomarkerei

A melanoma malignum a bőr pigmenttermelő sejtjeiből kiinduló daganatos megbetegedés, melynek incidenciája világszerte meredeken emelkedik az elmúlt öt évtizedben. A betegség kiemelt fontosságát jelzi, hogy bár továbbra is csak a daganatos bőrbetegségek mintegy 5%-át képezi, a malignus melanoma felel a bőrrákból adódó halálozások több, mint feléért [73,74]. Ez elsősorban a daganat kiemelkedő metasztatikus potenciáljával függ össze, mely révén rövid idő alatt áttétet képez más szervekben, elsősorban a nyirokcsomókban, az agyban, a májban és a tüdőben [75]. A betegség kezelése jelentős költségekkel jár az egészségügyi ellátórendszer számára, mely egyaránt összefügg a növekvő esetszámmal, az áttétképző hajlammal, a nagyszámú diagnosztikai módszer alkalmazásával, a műtétek szükségességével, továbbá a drága biológiai terápiák elterjedésével [76]. A hosszútávú túlélés elsősorban a kezdeti stádiumú tumor műtéti eltávolításával biztosítható, ezért különösen fontos a melanoma korai felismerése [77]. Erre jelenleg az anyajegyek rendszeres dermatoszkópos szűrővizsgálatát ajánlják, mely magasan képzett szakembert igényel, ennek ellenére eredménye nagyban függ a vizsgáló személytől [78]. A melanoma diagnózisa kórszövettani (hisztopatológiai) alapokon nyugszik, melyet a gyanús képlet kimetszését követően végeznek el. Pozitív eredmény esetén gyakran sor kerül egy újabb műtéti beavatkozásra is (reoperáció), mely során az anyajegy körül terjedő, megmaradt daganatsejteket távolítják el. Mivel a melanoma képes gyorsan szóródni a szervezetben a nyirokkeringés által, gyakran lép fel nyirokcsomó érintettség, különösen nyirokmirigyhez közeli daganat esetén. Ezekben az esetekben nyirokcsomó biopsziát is végeznek, és az érintettség beigazolódása esetén a reoperációra gyakran a nyirokcsomó eltávolításával együtt kerül sor. Nem egyértelmű eredmény esetén alkalmazhatnak immunhisztokémiai módszereket a diagnózis támogatására. A célra leggyakrabban alkalmazott markerek, a HMB45 antigén, a melan-A fehérje és a mikroftalmia-asszociált transzkripciós faktor (MITF). Ezek hiányossága, hogy a melanociták pigmentációs mechanizmusában játszanak szerepet, ezért bár érzékenyek a melanomára nézve, specifikusságuk alacsony, mivel az anyajegyek jóindulatú elváltozása (*melanocytic nevus*) is fokozza termelődésüket [79]. Ezenfelül az immunhisztokémiai módszerek nem jelentenek kevésbé invazív alternatívát a kórszövettani vizsgálatokhoz képest.

A fent említett okok miatt szérumbiomarkerek alkalmazása jelentősen növelhetné a szűrés sikerességét, illetve a betegség kevésbé invazív módon történő diagnózisát, különösen olyan páciensek esetén, akik nagyszámú atípusos anyajeggyel rendelkeznek [74]. A rutinszerűen alkalmazott markerek közé tartozik a laktát dehidrogenáz (LDH) és az S100B kalciumköti fehérje. A klinikai gyakorlatban főként utóbbit alkalmazzák, mivel szérumbiomarkereinek koncentrációja jól korrelál a tumortömeggel. Ennek megfelelően kitűnően alkalmas a betegség progressziójának, illetve a terápia sikerének értékelésére. Szűrési célra és a diagnózis támogatására viszont csak korlátozott mértékben alkalmas, tekintve hogy alacsony tumortömeg esetén gyakran szolgáltat fals negatív eredményt, továbbá számos egyéb kórképben megfigyelték emelkedett koncentrációját [80,81].

Jelenleg is több ígéretes kutatás irányul új tumormarkerek kifejlesztésére. Zaenker és munkatársai 10 tumorspecifikus autoantitest kombinálásával, 79%-os érzékenység és 84%-os specificitás mellett képesek voltak megkülönböztetni primer melanomás betegeket és egészséges önkénteseket, egy 245 mintán végzett kutatás során [82]. A legújabb vizsgálatok a szervezetben keringő tumorsejteket, daganat eredetű DNS-t, valamint különböző mikro-RNS molekulákat vizsgálnak, de ezen fejlesztések többnyire prognózisértékelésre és a melanoma patomechanizmusának mélyebb megértésére irányulnak [83].

## 2. Célkitűzések

A doktori értekezés két független kutatási projektet mutat be. Az első projektet kutatócsoportunk a Semmelweis Egyetem NAP 2 Genetikai Agyi Képző Migrén Kutatócsoporttal végezte együttműködésben. Az átfogó klinikai kutatás keretén belül doktori munkám célkitűzése, hogy kifejlesszek egy validált bioanalitikai módszert nyolc potenciális migrén-biomarker humán vérplazmából történő kvantitatív meghatározására, és a módszert sikerrel alkalmazzam mintegy 800 minta mérésére. A meghatározni kívánt kismolekulák közé tartozik a triptofán, öt LNAA (valin, leucin, izoleucin, fenilalanin, tirozin), egy neurotranszmitter (szerotonin), továbbá egy triptofán metabolit (kinurenin), melyet szintén összefüggésbe hoztak a migrén kialakulásával [84]. A bioanalitikai módszer magában foglalja egy mintaelőkészítési eljárás és egy LC-MS/MS módszer kifejlesztését, melyek lehetővé teszik az analitok gyors és érzékeny meghatározását, viszonylag kis mennyiségű plazmából (~1,5 ml). Mivel az aminosavak között izomerek is megtalálhatók (leucin és izoleucin), különösen nagy hangsúlyt kell fektetni ezek egymás melletti szelektív meghatározására. Az analitok endogén jellegéből adódóan további célkitűzés volt egy olyan *fit for purpose* kvantitálási/validálási stratégia adaptálása, mely lehetővé teszi a vonatkozó irányelvekben foglalt kritériumok kielégítését. A relatíve sok analit, a nagyszámú minta, a kis mintamennyiség, valamint a komponensek migrénes betegekben várható alulregulációja miatt, választásom a helyettesítő mátrix megközelítésre esett. További célom, hogy a vérplazma és a mesterséges mátrix közti parallelizmus kérdését részletesen megvizsgáljam, és demonstráljam, hogy a közegek megfeleltethetők egymásnak, lehetővé téve a kalibráló és minőségellenőrző minták helyettesítő mátrixban történő elkészítését és a módszer validálását.

A második projekt kutatócsoportunk kezdeményezésére, a Semmelweis Egyetem Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinika munkatársaival együttműködésben valósult meg. Célkitűzésünk egy átfogó klinikai kutatás megvalósítása, mely az AGP biomarker jellegének vizsgálatára irányul malignus melanomában, melynek jelenleg nincs szűrési és diagnosztikus célú szérumbiomarkere. A kutatás során melanomás betegek és egészséges önkéntesek szérummintáját gyűjtöttem. A mintákból AGP-t izoláltam, szénhidrát tartalmukat felszabadítottam enzimatis emésztéssel, és antranilsavas származékot képeztem belőlük. Célom egy olyan hidrofil kölcsönhatású

kromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometriás módszer (HILIC-MS/MS) fejlesztése volt, mely az adott monoszacharid-összetétellel jellemezhető glikánok vizsgálata mellett nagy hangsúlyt fektet az izomerek kromatográfiás elválasztására is, lehetővé téve az eddigi módszereknél nagyobb számú AGP glikánizomer azonosítását. További célkitűzésem, hogy azonosítsam azokat a szerkezeti változásokat, melyek a szérum AGP glikozilációs mintázatában mennek végbe a betegség hatására, és az eredményeket értékeljem biomarkerként való alkalmazhatóság szempontjából. További cél, hogy az eredményeket kifejezzem biomarkerek értékelésére szolgáló teljesítményjelzőkkel (érzékenység, specifikusság, pozitív prediktív érték, negatív prediktív érték) és a vizsgált populációban összehasonlítsam az S100B teljesítményével, mely a melanoma legelterjedtebb, rutin szerológiai markere. Az AGP glikozilációs profiljára irányuló vizsgálatok végső célkitűzése annak a döntésnek a támogatása, hogy a vizsgálati eredmények alapján érdemes-e további kutatásokat végezni, melyek a biomarker validálására és széleskörű alkalmazására irányulnak.

### 3. Módszerek

#### 3.1. Anyagok

LC-MS minőségű acetonitrilt (ACN), metanolt, hangyasavat (FA), HPLC minőségű abszolút etanolt, kloroformot és ammóniát (32%), valamint analitikai minőségű ortobórsavat és nátrium-acetát-trihidrátot a VWR Chemicals-től vásároltunk (Pool, Anglia). Humán szérum AGP-t ( $\geq 99\%$ ) és HSA-t ( $\geq 96\%$ ), molekuláris biológiai minőségű dikálium-hidrogén-foszfátot ( $K_2HPO_4$ ), nátrium-dodecil-szulfátot (SDS),  $\beta$ -merkaptóetanolt ( $\beta$ ME), etilén-diamin-tetraecetsavat (EDTA), foszfát pufferes sóoldatot (PBS) és a következő standardokat a Sigma Aldrich-től (St. Louis, MO, USA) szereztük be: szerotonin ( $\geq 98\%$ ), l-leucin-5,5,5- $d_3$  (99% D atom), l-tirozin-(fenil-3,5- $d_2$ ) (98% D atom). Fractogel TMAE-650 (M) anioncserélő töltetet a Merck-től (Darmstadt, Németország), Sephadex G25 (superfine) gélt a GE Healthcare-től (Chicago, IL, USA) vásároltuk. LC-MS tisztaságú trifluoecetsavat (TFA), antranilsavat (2-aminobenzoesav) ( $\geq 99\%$ ) és molekuláris biológiai tisztaságú nátrium-kloridot (NaCl) a Fisher Chemicals-től (Hampton, NH, USA) rendeltük. Leucin (99,9%), izoleucin (99,5%), valin (99,3%), fenilalanin (99,0%) és tirozin (99,7%) standardokat a Dr. Ehrenstorfer cégtől vásároltuk (Augsburg, Németország). Triptofánt ( $\geq 99\%$ ) és bisz-trisz-propánt az Alfa Aesartól (Haverhill, MA, USA), kinurenint ( $\geq 98\%$ ) a Cayman Chemicals-től (Ann Arbor, MI, USA), nátrium-cianoborohidridet (95%) az Acros Organics-től, peptid:*N*-glikozidáz F enzimet (PNGáz F) pedig a Roche Diagnostics-től vásároltunk. A Vacuette<sup>®</sup> és K<sub>3</sub>EDTA vérévételi csöveket a Greiner Bio-One International-től szereztük be (Kremsmünster, Ausztria). Ultratiszta (Milli-Q) vizet egy Merck-Millipore Simplicity<sup>®</sup> víztisztító berendezéssel állítottunk elő (Darmstadt, Németország).

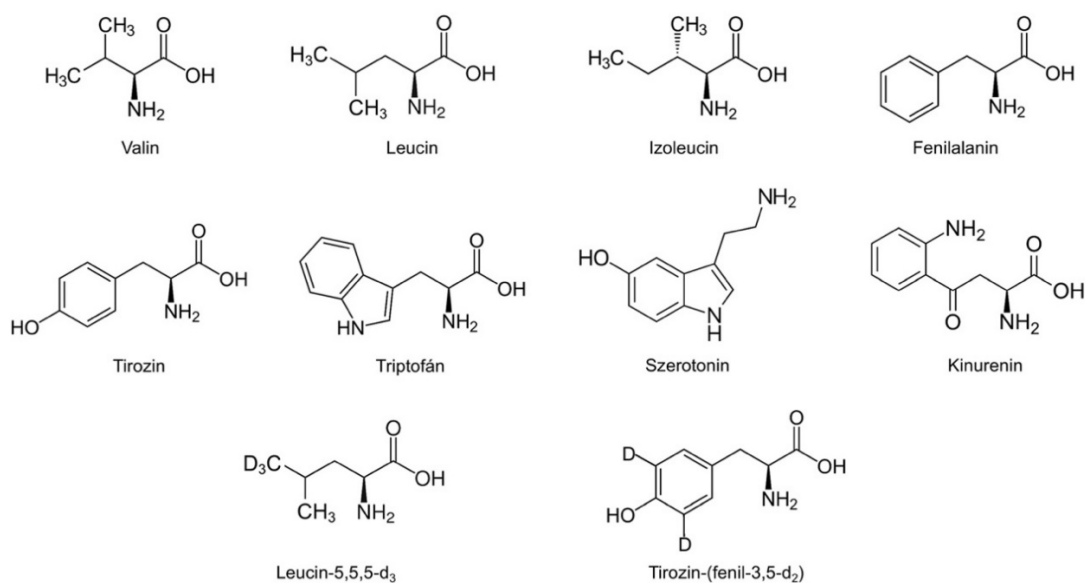
#### 3.2. Migrén-biomarkerek meghatározása vérplazmából

##### 3.2.1. Klinikai minták, standard oldatok, mintaelőkészítés

A klinikai kutatásba összesen 98 migrénes beteget és egészséges kontroll egyént vontak be, akiktől mintegy 800 vérmintát gyűjtöttek. Az önkéntesektől vett 3 ml vért K<sub>3</sub>EDTA csövekbe gyűjtötték, centrifugálták, az így nyert plazmamintákat pedig  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ -on tárolták a vizsgálatig. A validálási vizsgálatokhoz használt poolozott plazmamintákat hat egészséges önkéntes plazmájának egyesítésével nyertük. A minták gyűjtését és

kutatói célú felhasználását a Semmelweis Egyetem Regionális, Intézményi Tudományos és Kutatásügyi Bizottsága engedélyezte.

A nyolc analitához két stabil izotóp jelzett belső standardot (BST-t) alkalmaztam az extrakciós hatásfokból és mátrixhatásból adódó potenciális mérési hibák kiküszöbölésére. Az alifás aminosavakhoz (valin, leucin, izoleucin) leucin-5,5,5-d<sub>3</sub>-at (Leu-d<sub>3</sub>), az aromás komponensekhez (fenilalanin, tirozin, triptofán, szerotonin, kinurenin) pedig tirozin-(fenil-3,5-d<sub>2</sub>)-t (Tir-d<sub>2</sub>) használtam. Az analitok és BST-k szerkezetét a **4. ábra** mutatja be.



**4. ábra** Az analitok és stabilizotóp jelzett belső standardok szerkezete

Az analitok és BST-k törzsoldatait víz (0,2% TFA) és ACN 85:15 arányú elegyében készítettem el és  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltam. A vizsgálat napján, a kalibrációhoz és minőségellenőrzéshez külön elkészített törzsoldatokból vízzel készítettem hígítást. A két BST törzsoldatát szintén vízzel hígítottam, így Leu-d<sub>3</sub>-ra 250  $\mu\text{g/ml}$ , Tir-d<sub>2</sub>-re nézve pedig 25  $\mu\text{g/ml}$  koncentrációt kaptam. A helyettesítő mátrix készítéséhez 4 g humán szérum albumint (HSA) feloldottam 100 ml foszfát pufferes sóoldatban (PBS).

A mintaelőkészítés fehérjekicsapással történt. A kalibrációs és QC minták készítéséhez 900  $\mu\text{l}$  helyettesítő mátrixhoz 100  $\mu\text{l}$  standard oldatot, és 20  $\mu\text{l}$  BST keveréket adtam. A vizsgálati minták esetén 900  $\mu\text{l}$  plazmához 100  $\mu\text{l}$  MQ vizet és 20  $\mu\text{l}$  BST mixet pipettáztam. Ezt követően a mintákhoz 200  $\mu\text{l}$  TFA-t adtam fehérjekicsapás



céljából, 10 másodpercig rázattam vortex készülékkel, majd centrifugáltam (4000 rpm, 10 perc, 4 °C). A keletkező felülúszóból 150 µl-t mintatartóba pipettáztam, és 5 µl-t injektáltam az LC-MS/MS rendszerbe.

### 3.2.2. RP-HPLC-MS/MS

A kromatográfiás elválasztások egy Agilent 1260 Infinity típusú UHPLC rendszerrel történtek (Agilent Technologies, CA, USA), egy Agilent Zorbax Eclipse XDB C8 előtétoszloppal ellátott (4.6 mm × 12.5 mm, 5 µm) Supelco Ascentis® Express C18 kolonnán (3.0 mm × 150 mm, 2.7 µm, 100 Å). A kolonnatermosztátot 25, a mintaadagoló tálcáját pedig 4 °C-ra állítottam. A mérendő komponensek elválasztása izokratikus körülmények között, víz (0,2% TFA) – ACN 85:15 arányú eluensösszetétel mellett 6,5 perc alatt valósult meg 0,4 ml/perc-es áramlási sebességet alkalmazva. Az áthordás (*carry-over*) minimalizálása érdekében az injektálások közé 10 másodperces tūmosást iktattam be.

Az eluálódó komponensek tömegspektrometriás vizsgálata egy elektropray ionforrással ellátott Agilent 6460 Triple-Quadrupole készülékkel történt (Agilent Technologies, CA, USA), a következő beállítások mellett: kapilláris feszültség, +3,5 kV; szórófej feszültség, +400 V; nitrogén porlasztógáz áramlási sebesség, 45 psi; vivőgáz áramlási sebesség, 10 l/perc (350 °C); köpenygáz áramlási sebesség, 11 l/perc (350 °C). A méréseket *multiple reaction monitoring* (MRM) módban végeztem, biztosítva az analitok érzékeny és szelektív detektálását. Az MRM átmeneteket, az ütközési energia és a fragmentor feszültség értékeit a MassHunter Data Acquisition szoftver (verziószám: B.04.01) Optimizer funkciójával állítottam be minden mérendő komponensre és BST-re. Az adatok kiértékelését MassHunter Qualitative analysis (verziószám: B.05.00) és Quantitative QQQ Analysis (verziószám: B.05.01) szoftverekkel, illetve Microsoft Excellel végeztem.

### 3.2.3. Bioanalitikai módszervalidálás

A mérendő komponensek közös törzsoldatából két párhuzamos, 8 pontos kalibráló sorozatot hígítottam, *spikeoltam* velük a mesterséges plazmát, és a mintaelőkészítési procedúra elvégzése után, minden mérési sorozat elején és végén lefuttattam ezeket. A kalibráló sor koncentrációtartományát minden analit esetén úgy állítottam be, hogy a legalacsonyabb pontja a kvantitálás alsó határával (*lower limit of*

*quantitation*, LLOQ), legmagasabb pontja pedig a felső határral (*upper limit of quantitation*, ULOQ) essen egybe (**I. táblázat**). A kalibráló egyenesek felvétele úgy történt, hogy az analit és a BST csúcsterület arányát ábrázoltam az analit koncentrációjának függvényében, és az egyeneseket  $1/x$  szerint súlyoztam.

A QC mintákat az EMA bioanalitikai módszervalidálásra vonatkozó irányelvei alapján készítettem el. Az aminosavak esetén négy QC koncentrációsztet: LLOQ, alacsony QC (low QC, LQC), közepes QC (medium QC, MQC), magas QC (high QC, HQC), a szerotonin és kinurenin esetén pedig (a kis koncentrációtartományra való tekintettel) hármát (LLOQ, LQC, HQC) vizsgáltam [12]. Tekintettel arra, hogy a QC minták helyettesítő mátrixban készültek, a kvantitatív analízist potenciálisan befolyásoló különböző mátrixhatások monitorozására egy további minőségellenőrző mintát is készítettem poolozott plazmából, melyben a komponensek endogén koncentrációját standard addícióval határoztam meg. A napon belüli torzítatlanság (*accuracy*) és pontosság (*precision*) nyomonkövetése öt párhuzamosan előkészített minta mérésével történt, minden QC szinten. A napok közötti torzítatlanság és pontosság meghatározása a napon belüli procedúra, öt egymást követő napon való ismétlésével történt.

**I. táblázat** Kalibrációs tartomány és QC koncentrációk

QC		Mesterséges plazma				Poolozott plazma
Analit	Kalibrációs tartomány (µg/ml)	QC szint (µg/ml)				
		LLOQ	LQC	MQC	HQC	
Valin	1–100	1	3	20	80	24,05
Leucin	1–100	1	3	20	80	13,09
Izoleucin	0,5–50	0,5	1,5	10	40	7,82
Fenilalanin	1–100	1	3	20	80	6,98
Tirozin	0,5–50	0,5	1,5	10	40	11,88
Triptofán	0,5–50	0,5	1,5	10	40	7,81
Szerotonin	0,1–2,5	0,1	0,3	-	2	0,20
Kinurenin	0,1–2,5	0,1	0,3	-	2	0,44

Az extrakciós hatásfokot a mintaelőkészítés előtt (*pre-spiked*) és után (*post-spiked*) hozzáadott standard oldat válaszjeleinek összehasonlításával vizsgáltam, hat párhuzamos mintán. A *pre-spiked* minták előkészítése a QC mintákkal azonos módon történt, tehát 900 µl mintához 100 µl standardot és 20 µl BST-t adtam, majd elvégeztem a fehérjekicsapást 200 µl TFA-val, és centrifugáltam a mintát. *Post-spiked* minták esetén 1 ml helyettesítő mátrixot (*blank* minta) 200 µl TFA-val kezeltem, és a centrifugált minta felülúszójának 90 µl-éhez 10 µl standardot és 2 µl BST-t adtam.

Bioanalitikában a parallelizmus kifejezést általában annak az értékelésére használják, hogy a kalibrációs és minőségellenőrző mintákban mért analitikai válaszjel milyen mértékben képes leképezni a biológiai mátrixban kapott eredményeket, mennyire mutat párhuzamosságot azzal [24]. Helyettesítő mátrix alkalmazása esetén ezek a vizsgálatok kritikus jelentőséggel bírnak, tekintve hogy nagyfokú parallelizmus esetén a biológiai közeg és a helyettesítő mátrix között nincs számottevő különbség extrakciós hatásfok és mátrixhatás tekintetében, megfeleltethetők egymásnak. A parallelizmus meghatározását a Houghton és munkatársai által kidolgozott eljárás alapján végeztem [85]. Ennek során hat egyéni plazmamintát két-két részletre osztottam. Az egyik részletéből meghatároztam a komponensek endogén koncentrációit standard addícióval. A plazma másik részletét MQC oldattal *spikeoltam*, majd a minta részleteit kétszeresére, ötszörösére, illetve tízszeresére hígítottam a helyettesítő mátrixszal. Ezt követően a hígított minták koncentrációját meghatároztam a helyettesítő mátrixban előkészített kalibrálókat alkalmazva [85]. A teljes folyamatot három alkalommal ismételt meg. Tekintve, hogy a parallelizmus vizsgálat során a minta hígítása történik, a kísérlet hígítási integritás vizsgálatként is értelmezhető.

A törzsoldatok és munkaoldatok stabilitását vizsgáltam szobahőmérsékleten (20 °C) 24 óráig és 10 °C-on 10 napig. A nyolc analit standard munkaadatainak vizsgálata *bracketing* megközelítéssel történt: csak a legalacsonyabb és a legmagasabb koncentrációt vizsgáltam, utóbbi a törzsoldatot is jelentette. Az analitok mátrixstabilitását LQC és HQC, valamint poolozott plazmamintákban is vizsgáltam, három párhuzamos előkészítést végezve, különböző körülmények között: szobahőmérsékleten 24 óráig, -20 °C-on két hónapig, illetve három fagyasztás-olvasztás cikluson keresztül. Az előkészített minták stabilitását szobahőmérsékleten 12 óráig, és a mintaadagoló tálcahőmérsékletén (4 °C) 24 óráig vizsgáltam.

Az egymást követő kromatográfiás futásoknál fellépő áthordás tesztelésére poolozott plazmamintát *spikeoltam* a legmagasabb koncentrációjú kalibráló oldattal. A mintát feldolgoztam a fent említett mintaelőkészítési módszerrel, és a minta mérése után közvetlenül *blank* mintát injektáltam a rendszerbe, majd értékeltem az analitok és a belső standardok válaszjelét.

### 3.3. Az AGP biomarker jellegének vizsgálata melanomában

#### 3.3.1. Klinikai minták

A klinikai minták gyűjtését és kutatási célú felhasználását a Semmelweis Egyetem Regionális, Intézményi Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága engedélyezte (regisztrációs szám: SE RKEB 30/2020). A minták gyűjtése a Semmelweis Egyetem Bőr, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinikáján történt. A vérvétel a melanoma malignum gyanús primer tumorra rendelkező páciensektől, a képlet műtéti eltávolításának napján történt. A kutatásba csak a szövettani diagnózis felállítása után, a minták egy kisebb köre került be. A beválasztás fontos szempontja volt a primer tumor stádiuma, mely alapján a pT3B, pT4A és pT4B stádiumú daganatok kerültek beválogatásra. A pT stádium a tumorvastagság (ún. Breslow vastagság) alapján osztályozza a daganatokat, az „a” és „b” jelzések pedig a tumoros ulceráció hiányát és meglétét jelzik. Az említett stádiumokban a betegek 20%-a várhatóan tíz éven belül meghal, ezért a primer tumortömeg alapján ezek a betegek magas rizikó csoportba sorolhatók, ún. *high-risk* melanomás betegnek tekinthetők [73]. További fontos szempont volt, hogy a betegek szentinel negatív nyirokcsomó státusszal rendelkezzenek, tehát ismert áttétük ne legyen, továbbá az egyéb daganatos betegség megléte is kizáró okként szolgált. Az említett kritériumok figyelembevételével, a hozzávetőlegesen 70 beérkezett mintából 18-at válogattunk be a további vizsgálatokba, ebből 5 nő és 13 férfi volt, 60,2 év átlagéletkorral. A betegcsoport klinikai paramétereit a **II. táblázat** foglalja össze. A kutatás keretében kontroll vérmintákat is gyűjtöttünk egészséges egyénektől, összesen mintegy 19-et, köztük 14 nő és 5 férfi volt, 59,5 éves átlagéletkorral. A vérminták egy részét elküldtük az S100B marker koncentráció meghatározására, másik részletét pedig adalékmentes vérvételi csövekbe gyűjtöttük, két órán át állni hagytuk szobahőmérsékleten, centrifugáltuk (20 perc, 4 °C, 4000 rpm), majd a szérumot (felülúszót) Falcon csövekbe pipettáztuk, és a feldolgozás napjáig –20 °C-on tároltuk.

**II. táblázat** A kutatásba bevont melanomás betegek klinikai paraméterei

<b>Eset</b>	<b>Státusz</b>	<b>Breslow vastagság (mm)</b>	<b>S100B szérumszint (µg/l)</b>
1	MM (nem besorolt) (pT4b)	4,53	0,05
2	NMM (pT3b)	3,28	0,06
3	NMM (pT4a)	7,70	0,06
4	SSM (másodlagos noduláris komponenssel) (pT4b)	5,50	0,04
5	NMM (pT4b)	9,30	0,16
6	MM (nem besorolt) (pT3b)	2,54	0,05
7	SSM (pT4a)	4,80	0,06
8	SSM (pT4a)	6,30	0,02
9	NMM (pT4b)	5,15	0,13
10	MM (nem besorolt) (pT3b)	2,40	0,34
11	NMM (pT4b)	11,00	0,8
12	NMM (pT4b)	13,00	1,9
13	SSM (pT3b)	3,93	0,04
14	NMM (pT4b)	7,50	0,05
15	NMM (pT4a)	4,50	22,24
16	NMM (pT4a)	5,50	1,33
17	NMM (pT4b)	7,60	0,08
18	NMM (pT4b)	4,33	0,03

*A stádiumbesorolás a 8<sup>th</sup> edition of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) tumor, node, metastasis (TNM) classification system alapján történt [77]. A Breslow vastagság a bőr felszínétől, a primer tumor legmélyebb pontjáig mért vastagságot jelenti, mikroszkóp alatt vizsgálva. pT3 esetén a Breslow vastagság 2,0 és 4,0 mm között van, pT4 esetén pedig 4,0 mm felett. A tumorvastagság utáni betű az ulceráció meglétére (a) vagy hiányára (b) utal. NMM noduláris, SSM pedig szuperficiálisan terjedő melanoma malignumra utal.*

### 3.3.2. Mintaelőkészítés

A szérumszámok előkészítése három főbb szakaszra osztható: az AGP izolálása vérszérumból, az oligoszacharid oldalláncok enzimátikus úton történő felszabadítása a fehérjéről és a glikánláncok antranilsavas származékképzése. Az AGP szérumból történő kinyerésére első lépésben nem elegendő fázisú oldószeres extrakciót alkalmaztam, amelyet Kremmer és munkatársai dolgoztak ki [86]. Ennek során egységnyi térfogatú (kb. 5 ml) szérumot 1:1 arányban hígítottam MQ vízzel. Ezt követően a szérum tizenötszörös térfogatának megfelelő kloroform-metanol (2:1) elegyet adtam a mintához. Az extrakciót csiszolatos dugóval ellátott Erlenmeyer lombikokban végeztem egy körkörös síkrázó géppel, 0-4 °C-ra temperált vízfürdőn. A rázatási sebességet 120/perc-re állítottam. 45 perc elteltével a szérum 2,5-szeres térfogatának megfelelő mennyiségű jéghideg MQ

vizet adtam a mintákhoz, majd további 15 percig folytattam a rázatást. Az extrakciót követően centrifugáltam a lombikok tartalmát (20 perc, 4°C, 4000 rpm), majd a felső (vizes-metanolos) fázist centrifugacsőbe gyűjtöttem és háromszoros térfogatú abszolút alkohol hozzáadásával csaptam ki az oldat fehérjetartalmát. A mintát centrifugáltam (5 perc, 4°C, 4000 rpm), a felülúszót eltávolítottam, és a csapadékot a preparatív ioncsere kromatográfia „A” jelű pufferének 2 ml-ében oldottam, és 0,5 ml-es részletekben injektáltam. Az AGP további tisztítása azért szükséges, mert az extrakciót követően a minta tartalmazhat kisebb mennyiségben egyéb szérumfehérjéket, főként albumint. A tisztítási lépésre egy Pharmacia középnyomású kromatográfot használtam, az elválasztás pedig egy erős anioncserélővel, Fractogel EMD TMAE-650-nel töltött Pharmacia oszlopon (5 × 0,5 cm) történt. A detektálást 280 nm-es hullámhosszon UV detektorral végeztem. A gradiens elúciós módszer „A” eluense 25 mM bisz-trisz-propánt tartalmazott (pH=7,5), a „B” eluens pedig 25 mM bisz-trisz-propánt és 350 mM NaCl-ot (pH=9,5). Az eredeti módszert kissé módosítottam, így 1,5 ml/perc áramlási sebesség mellett az eluens-összetétel a következőképp alakult az elválasztás során: 0-1,7 perc, 0% B; 1,8-10,0 perc 50% B; 10,1-18,0 perc, 60% B; 18,1-21,0 perc, 100% B; 21,1-25,0 perc, 100% B; 25,1-26,0 perc, 0% B; 26,1-30,0 perc, 0% B. A 11 és 17 perc között eluálódó AGP frakciót főzőpohárba gyűjtöttem, az ugyanazon mintából származó frakciókat egyesítettem, majd fagyasztva szárítottam. A liofilizálás körülményei a következők voltak: a mintákat -40 °C-on fagyasztottam 2 órán keresztül, ezt követően 10 órán át szárítottam 20 °C-os tálcáfűtés mellett, majd további 10 órán keresztül 30 °C-os tálcáfűtéssel. A liofilizátumot feloldottam 5 ml MQ vízben, majd gélkromatográfias módszerrel egy Sephadex G-25 kolonnán (15 × 2,5 cm) tisztítottam meg a pufferkomponensektől és a sótól, 2 ml/perc áramlási sebességű MQ vizes elúcióval. A detektálás ebben az esetben is UV detektorral, 280 nm-en történt. Az AGP 12 és 22 perc között eluálódott, melyet főzőpohárba gyűjtöttem, liofilizáltam, majd 2-8 °C között tároltam további felhasználásig.

Az AGP oligoszacharid oldalláncainak enzimátikus emésztését az Elliott és munkatársai által kidolgozott módszer alapján végeztem, melyet kutatócsoportunk kis mértékben módosított [87]. A fehérje 2 mg-os mennyiségét 600 µl 50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> és 2 mM EDTA tartalmú pufferben oldottam (pH=7,4). 12 µl 5%-os SDS és 16 µl 10%-os βME (frissen hígított) hozzáadását követően az AGP-t 10 percig denaturáltam 100 °C-os

blokk termosztátban, majd a mintát 10 percen át  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on hűtöttem. A hűtés során kicsapódó SDS-t centrifugálással távolítottam el a rendszerből (5 perc,  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 14800 rpm). A felülúszót Eppendorf csőbe pipettáztam, hozzáadtam 6 nemzetközi egység PNGáz F enzimet, és 26 órán keresztül  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltam blokk termosztátban. Az enzimreakciót követően az oldat fehérjetartalmát 6 ml abszolút etanol hozzáadásával csaptam ki, a csapadékot centrifugáltam (5 perc,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 4000 rpm), a felülúszót pedig nitrogénáram alatt szárítottam (30 perc,  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). A mintát  $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$  között tároltam további felhasználásig.

Az AGP szénhidrát tartalmának antranilsavas származékképzését az Anumula és munkatársai által kidolgozott protokoll alapján végeztem [88]. Az antranilező reagens alapadata 4% nátrium-acetát-trihidrátot és 2% ortobórsavat tartalmaz. Közvetlenül az antranilezési reakció előtt ml-enként 20 mg nátrium-cianoborohidridet és 30 mg antranilsavat oldottam fel az alapoldatban. Az így elkészített reagensből 2 ml-t adtam a mintákhoz, és az elegyet lezárt centrifugacsőben 60 percen keresztül,  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltam. A reakció végeztével a mintát szobahőmérsékletre hűtöttem, majd háromszorosára hígítottam MQ vízzel. Az oldatot a fent említett gélkromatográfiás módszerrel tisztítottam meg a reagens feleslegétől, a minták víztartalmát pedig fagyasztva szárítással csökkentettem, és az analízis napjáig  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltam.

### 3.3.3. HILIC-MS/MS

A származékolt szénhidrátok analitikai vizsgálataira HILIC-MS/MS módszert fejlesztettem. A kromatográfiás elválasztásokat egy Dionex UltiMate 3000 UHPL készüléken végeztem (Thermo Scientific, Bremen, Németország), egy Phenomenex Luna<sup>®</sup> NH<sub>2</sub> aminopropil-szilika állófázison (250 mm × 3 mm, 5 μm, 100 Å). A mintaadagoló tálcáshűtését  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra, a kolonnatermosztátot pedig  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra állítottam. Az elválasztás „A” eluenseként 200 mM ammónium-formiátot (pH=3,5), „B” eluenseként ACN-t alkalmaztam. 0,4 ml/perc áramlási sebesség mellett az eluens-összetétel a következőképpen változott a kromatográfiás futás során: 0-3 perc, 70% B; 3-95 perc, 70-5% B; 95-110 perc, 5% B; 110-111 perc, 5-70 B%; 111-130 perc, 70 B%. Az analízishez a liofilizált mintákat 200 μl kiindulási eluensben oldottam (70% B), és 100 μl-t injektáltam az LC-MS rendszerbe.

Az eluálódó glikánok MS és MS/MS vizsgálatai egy Q Exactive Focus Orbitrap tömegspektrométerrel történtek (Thermo Scientific, Bremen, Németország). A készülék

elektrospray ionforrással felszerelt, melyet negatív módban működtettem. Az optimált MS paraméterek a következők voltak: kapilláris feszültség, 2,8 kV; porlasztógáz áramlási sebessége, 32 psi; segédgáz áramlási sebessége, 7 psi; függőnygáz áramlási sebessége, 0 psi; automatikus erősítésvezérlő (automatic gain control, AGC) célérték, 3000000; maximális befecskendezési idő, 200 ms. A detektálás 17500-as felbontás mellett, 1000 és 2500 közötti  $m/z$  tartományban történt. Annak érdekében, hogy az MS/MS vizsgálatok során a kis intenzitású csúcsokról is értékelhető felvételt lehessen készíteni, egy poolozott beteg, és egy poolozott kontrollmintát készítettem tíz egyéni minta felhasználásával. Az egyesített mintákat vákuumcentrifuga segítségével szárazra pároltam, és a szárazanyagot felvettem 150  $\mu\text{L}$  kiindulási eluensben. Ezt követően a tandem MS felvételeket adatfüggő módon, a pontos tömeg alapján beazonosított prekursor ionokról vettem fel. A fragmentáció ütközés indukált disszociációval (*collision induced dissociation*, CID), 35%-os relatív ütközési energia alkalmazásával történt. A spektrumokat 17500-as felbontás mellett, 1000-2500 közti  $m/z$  tartományban regisztrálta a készülék.

A tömegspektrumok kiértékelésére az Xcalibur 3.1. szoftver QualBrowser funkcióját használtam (Thermo Scientific, Bremen, Németország). Az adatok feldolgozása Microsoft Excellel (Microsoft, Redmond, WA, USA) történt. A statisztikai vizsgálatokhoz az RStudio (RStudio, Boston, MA, USA), az adatok vizualizáláshoz pedig az mMass nevű programot használtam.



## 4. Eredmények

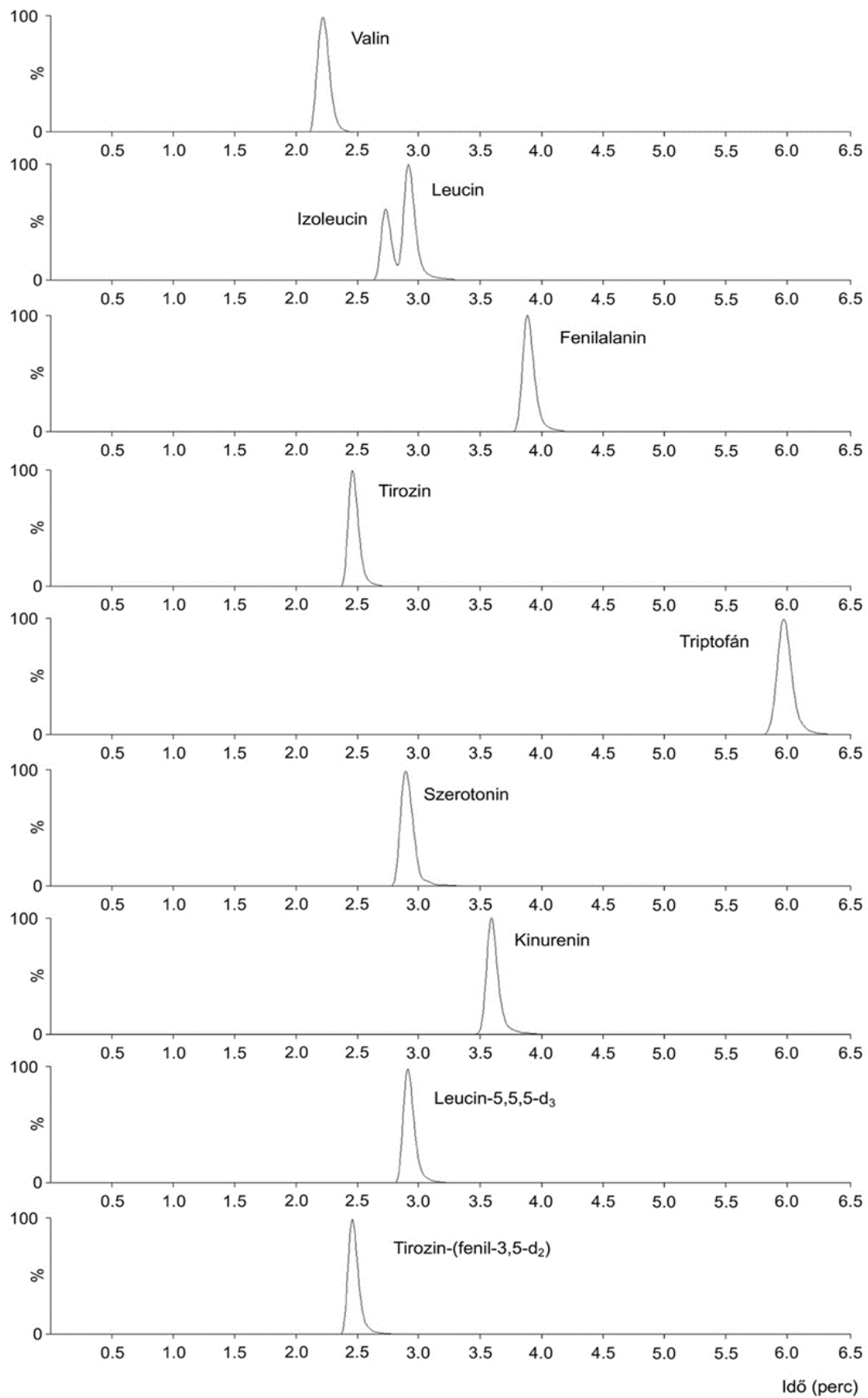
## 4.1. Migrén-biomarkerek meghatározása vérplazmából

## 4.1.1. RP-HPLC-MS/MS

A kutatás célkitűzése olyan, validált LC-MS/MS módszer fejlesztése volt, amely alkalmas valin, leucin, izoleucin, fenilalanin, tirozin és triptofán aminosavak, továbbá szerotonin és kinurenin egymás melletti gyors meghatározására, nagy áteresztőképesség mellett. A lehető legnagyobb szelektivitás és szenzitivitás elérése érdekében az MRM mérések paramétereit egyénileg optimaltam minden mérendő komponensre és belső standardra, amelynek eredményeit a **III. táblázat** mutatja be. Tekintve, hogy a leucin és az izoleucin izomer molekulák, nagyfokú szerkezeti hasonlóságuk miatt MRM átmenetük azonosnak adódott. A probléma kiküszöbölését az analitok kromatográfiás elválasztásával lehet elérni, a mintaelőkészítés munkaigényének számottevő növelése nélkül. Ahogy a **5. ábrán** látható reprezentatív MRM kromatogram mutatja, a kifejlesztett kromatográfiás módszer alkalmasnak bizonyult a két komponens elválasztására izokratikus körülmények között is, így nem kell számolni a kromatográfiás futások közti reekvilibrációs idővel, különösen alkalmassá téve a módszert nagyszámú minta analízisére.

**III. táblázat** Az analitok és belső standardok optimalt MRM paramétereit

Komponens	Átmenet ( $m/z$ )	Fragmentor feszültség (V)	Ütközési energia (eV)
Valin	118 → 72	10	8
Leucin	132 → 86	2	8
Izoleucin	132 → 86	2	8
Fenilalanin	166 → 120	2	8
Tirozin	182 → 136	30	12
Triptofán	205 → 188	40	4
Szerotonin	177 → 160	45	4
Kinurenin	209 → 192	45	4
Leucin-5,5,5-d <sub>3</sub>	135 → 89	45	4
Tirozin-(fenil-3,5-d <sub>2</sub> )	184 → 138	45	10



5. ábra Az analitik és belső standardok extrahált MRM kromatogramjai

#### 4.1.2. Bioanalitikai módszervalidálás

A kalibrációs egyenesek regressziós koefficiensei ( $r^2$ ) minden analitra legalább 0,998-nak adódott, biztosítva a kalibrációs tartomány megfelelő linearitását. Néhány plazmamintát leszámítva (<1%), ahol egy-egy analit koncentrációja kiugróan magasnak bizonyult, a kalibráció lefedte a mérendő komponensek teljes koncentrációtartományát. LLOQ alatt azt a legalacsonyabb koncentrációt értjük, amelyet elfogadható torzítatlanság és pontosság mellett meg tudunk határozni, értéke nagymértékben függ a készülék érzékenységétől. Endogén anyagok esetén az LLOQ eredeti definíció szerinti értékének ismerete kevésbé fontos, mint a gyógyszermolekulák, illetve azok metabolitjai esetén, mivel ez az érték jó eséllyel jelentősen kívül esik a fiziológias szempontból releváns koncentrációtartományon. Jelen kutatásban csak a szerotonin és a kinurenin LLOQ értékét határoztam meg ezzel a módszerrel, melyek egy-két nagyságrenddel kisebb koncentrációban voltak jelen, mint az aminosavak. Ezért az aminosavak esetén egy pragmatikusabb módszert követve, a poolozott plazmaminták koncentrációjának hozzávetőlegesen egytizedére állítottam be az LLOQ értékét. Ezzel a megközelítéssel megkönnyíthető a kalibrációs standardok és a hígítási sorozatok elkészítése, különösen nagyszámú mérendő komponens esetén, és lefedhető a teljes (releváns) koncentrációtartomány, még akkor is, ha a mérendő komponens alulexpressziója várható [89].

A torzítatlanságot a nominális koncentráció százalékban kifejezett értékeként adtam meg (*relative error*, RE), a pontosság értékeit pedig relatív szórással fejeztem ki (*relative standard deviation*, RSD). Az elfogadási határ mindkét paraméter esetén  $\pm 15\%$ , kivéve az LLOQ-nál, ahol az EMA irányelve  $\pm 20\%$ -ot engedélyez. A validálás során, a napon belüli és napok közötti torzítatlanság értékei 87,4-114,3%, valamint 87,7-113,3% között alakultak, a napon belüli és napok közötti pontosság pedig 11,8 és 14,3%-on belül volt (**IV. táblázat**). Az eredmények alapján tehát a módszer megfelelően pontosnak és torzítatlannak bizonyult [12].

IV. táblázat a QC minták napon belüli és napok közötti torzítatlansága és pontossága

QC	Mesterséges plazma								Poolozott plazma		
	QC szint	LLOQ		LQC		MQC		HQC			
		RE	RSD	RE	RSD	RE	RSD	RE	RSD	RE	RSD
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
<b>Napon belüli</b>	Valin	111,7	7,4	93,0	11,8	100,4	11,3	110,8	8,8	92,4	3,7
	Leucin	102,7	5,7	95,3	2,5	93,8	4,9	89,7	3,3	90,9	4,0
	Izoleucin	114,3	7,2	104,8	3,3	108,0	3,2	113,3	7,0	101,3	3,9
	Fenilalanin	100,2	5,2	102,1	5,6	99,8	6,4	102,9	2,8	102,3	6,4
	Tirozin	98,6	4,3	87,4	2,5	88,9	10,5	103,7	4,2	107,0	3,3
	Triptofán	106,8	6,8	106,0	6,5	95,8	10,2	108,0	4,6	97,2	6,7
	Szerotonin	101,0	8,1	92,7	2,9	-	-	87,8	4,7	95,1	7,2
	Kinurenin	110,7	8,2	114,3	10,1	-	-	113,4	9,4	110,9	9,7
<b>Napok közötti</b>	Valin	107,6	10,2	96,5	11,9	97,0	9,7	111,7	9,0	91,5	5,3
	Leucin	102,5	6,4	95,6	7,8	91,5	5,6	92,4	7,1	95,8	8,2
	Izoleucin	114,4	8,2	106,7	9,6	103,0	6,8	112,6	8,3	106,4	8,7
	Fenilalanin	102,1	7,4	100,1	7,2	96,5	6,9	104,6	8,8	108,8	5,9
	Tirozin	111,2	14,3	102,3	13,3	102,9	10,7	109,5	7,6	104,5	3,5
	Triptofán	102,9	8,1	96,7	7,6	95,4	6,3	113,3	4,7	109,5	7,0
	Szerotonin	99,5	14,2	87,7	7,7	-	-	91,1	7,4	89,2	9,1
	Kinurenin	92,4	13,8	90,7	10,6	-	-	95,0	12,8	91,2	11,4

Az extrakciós hatásfok (%) megállapításához a standard oldattal mintaelőkészítés előtt (*pre-spiked*) és a mintaelőkészítés után (*post-spiked*) *spikeolt* mintákat készítettem. Értékét az analitok csúcs alatti területéből (AUC) számítottam ki a következő képlettel:

$$1. \text{ képlet} \quad \text{Extrakciós hatásfok} = \frac{AUC_{pre-spiked}}{AUC_{post-spiked}} \times 100$$

A belső standardra normalizált extrakciós hatásfokot (%) szintén kifejeztem az analit és a BST csúcsterületének hányadosából:

2. képlet

$$\text{BST-normalizált extrakciós hatásfok} = \frac{\text{Extrakciós hatásfok}_{\text{analit}}}{\text{Extrakciós hatásfok}_{\text{BST}}} \times 100$$

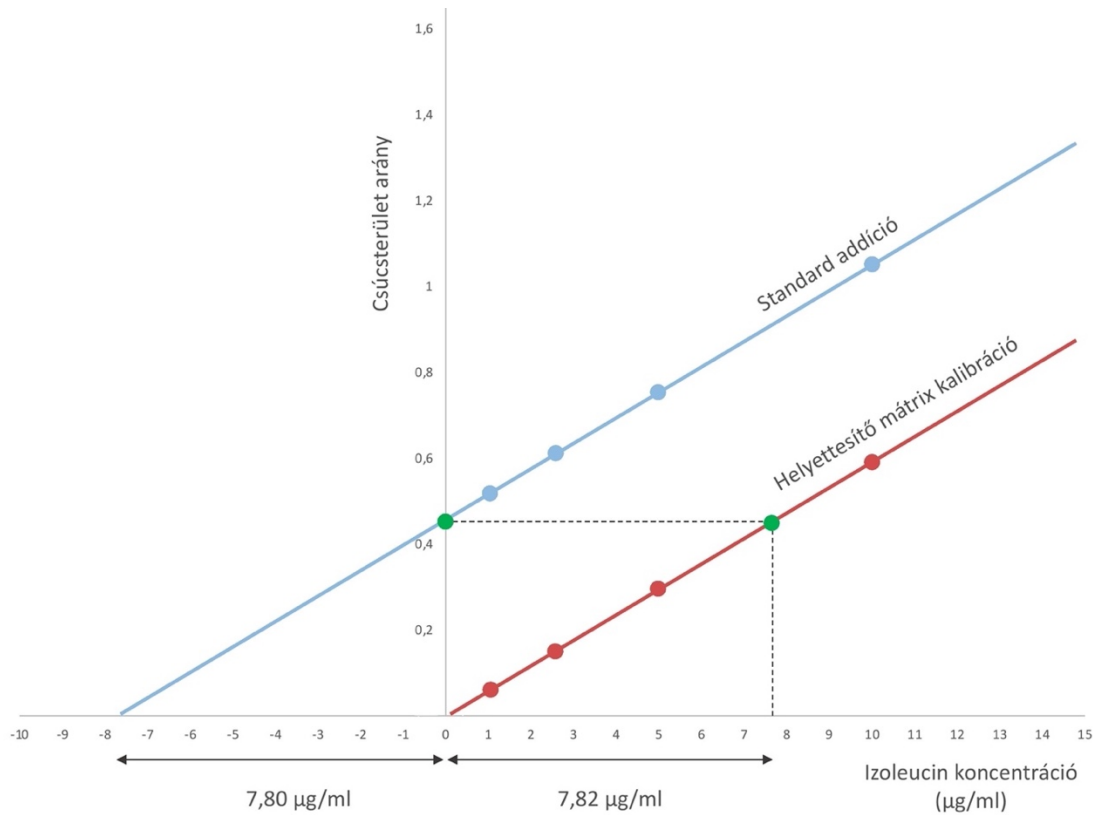
Az extrakciós hatásfok értékei 85,2 és 101,4% között alakultak, tehát a mintaelőkészítési procedúra nem befolyásolta számottevően a mérendő komponensek koncentrációját a mintákban, a BST normalizált extrakciós hatásfok 93,6 és 111,8% közötti értékei alapján pedig a belső standardok jól reprezentálják az analitokat (**V. táblázat**).

**V. táblázat** extrakciós hatásfokok és BST-normalizált extrakciós hatásfokok

<b>Komponens</b>	<b>Extrakciós hatásfok (%)</b>	<b>BST-normalizált extrakciós hatásfok (%)</b>
Valin	87,5	96,6
Leucin	101,3	111,8
Izoleucin	88,6	97,8
Fenilalanin	101,4	111,3
Tirozin	95,0	104,4
Triptofán	95,1	104,5
Szerotonin	85,2	93,6
Kinurenin	97,2	106,7
Leu-d <sub>3</sub>	90,6	-
Tir-d <sub>2</sub>	91,0	-

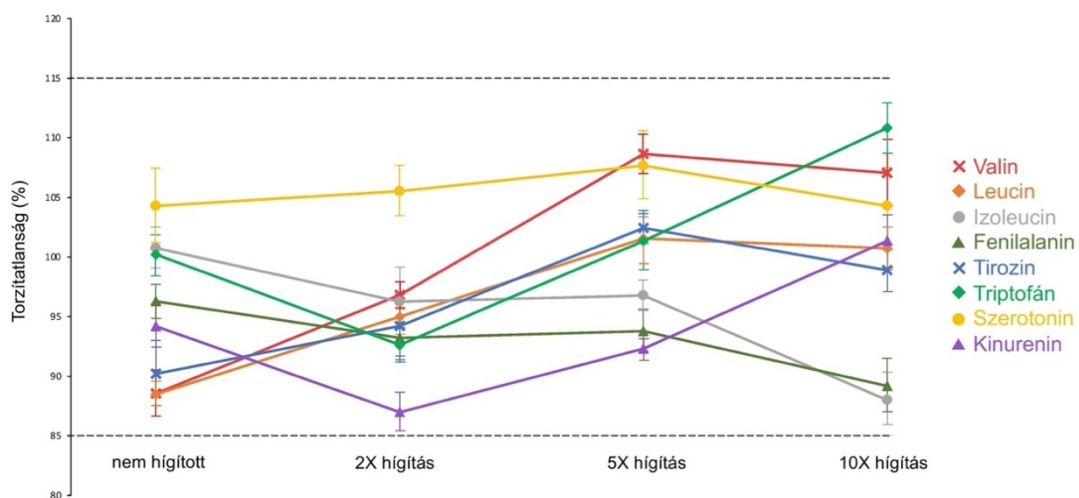
A parallelizmus vizsgálatokhoz meghatároztam hat egyéni plazmaminta háttérkoncentrációját standard addícióval. Ugyanezen minták koncentrációját meghatároztam a helyettesítő mátrixban felvett kalibráló egyenes alapján is, mely minden komponensre nagyon hasonló eredményt adott (10%-on belüli eltérés) (**6. ábra**). A minták másik részletét MQC oldattal *spikeoltam*, majd kétszeresére, ötszörösére és tízszeresére hígítottam mesterséges plazmával. Minden hígítási szinten három párhuzamos mintaelőkészítést végeztem, majd meghatároztam a koncentrációkat. Ahogy a **7. ábrán** látható, az analitkoncentráció minden hígítási szinten az elfogadási határon belül volt, következésképpen a mesterséges plazma hasonló extrakciós hatásfokot és

mátrixhatást biztosít, mint az emberi vérplazma, így alkalmas annak helyettesítésére a kalibráló és QC minták készítéséhez.



**6. ábra** A parallelizmus standard addícióval történő vizsgálatának illusztrációja az izoleucin példáján

A standard addíciós egyenes  $X$ -tengely metszetéről leolvasott analitkoncentráció megegyezik a mesterséges plazmában felvett kalibráló egyes alapján számított értékkel, parallelizmust feltételezve a mátrixok között.



**7. ábra** Parallelizmus értékelése hígítási integritás vizsgálattal

Az értékek három párhuzamos mérés átlagaiból adódtak, a kapott koncentrációt minden szinten megszorozva a hígítási faktorial.

A standardok törzsadatai és munkaadatai stabilnak bizonyultak 20 °C-on 24 óráig és 10 °C-on 10 napig. A humán és mesterséges plazmaminták háromszori lefagyasztása és felolvasztása nem befolyásolta az analitkoncentrációt, ahogy 24 óráig szobahőmérsékleten (20 °C), illetve 2 hónapig –20 °C-on történő tárolásuk sem. A feldolgozott minták koncentrációiban szintén nem történt számottevő változás 24 óra alatt a mintaadagoló hőmérsékletén (4 °C) valamint 12 óra alatt szobahőmérsékleten [12].

Az egymást követő LC-MS/MS mérések során fellépő áthordás vizsgálatához a legmagasabb koncentrációjú kalibráló oldattal *spikeolt* poolozott plazmamintát használtam, így biztosítva, hogy a kialakuló minta koncentrációja biztosan magasabb legyen, mint a fiziológiás szempontból releváns tartomány. Ahogy a **VI. táblázat** bemutatja, analitok esetén az áthordás nem haladta meg az LLOQ mennyiségének 17,2, BST-k esetén pedig az 1,0%-át, így megfelelt az EMA irányelveiben foglalt 20, illetve 5%-os határnak [12].

**VI. táblázat** Az analitok és belső standardok áthordási értékei

<b>Komponens</b>	<b>Áthordás (%)</b>
Valin	17,2
Leucin	4,8
Izoleucin	8,3
Fenilalanin	2,1
Tirozin	8,7
Triptofán	0,7
Szerotonin	2,6
Kinurenin	2,7
Leu-d <sub>3</sub>	1,0
Tir-d <sub>2</sub>	0,8

#### 4.1.3. Klinikai minták vizsgálata

A validált bioanalitikai módszert mintegy 800 szérumminta meghatározására alkalmaztam, melyet potenciális migrén biomarkerek azonosítása céljából gyűjtöttek 98 migrénes betegről, illetve egészséges önkéntestől. A mintákat tíz mérési sorozat keretében mértem le, minden sorozat elején és végén kalibráló, illetve QC mintákat is futtatva. Utóbbiak esetén a pontosság és torzítatlanság nem romlott a módszervalidálás

eredményeihez viszonyítva. Az EMA irányelveinek megfelelően vizsgáltam a mérések reprodukálhatóságát, a minták 10%-ának (n=80) ismételt mérésével. Tekintve hogy az ismétlések során mért hiba egyik minta esetén sem haladta meg a 18,2%-ot, az eredmények messzemenőig kielégítik az irányelvben foglalt kritériumokat, miszerint az eredményeknek 20%-os hibahatáron belül kell lennie, legalább az esetek 66,7%-ában. A minták kevesebb, mint 1%-ában a valin, izoleucin vagy tirozin koncentráció meghaladta az ULOQ-t. Ezekben az esetekben a plazmamintákat kétszeresére hígítottam mesterséges plazmával, és a mintaelőkészítést követően ismét lemértem őket. A **VII. táblázat** bemutatja az analitok koncentráció-tartományait a 800 plazmamintában [12].

**VII. táblázat** A mérendő komponensek koncentráció tartománya a 800 plazmamintában

<b>Analit</b>	<b>Koncentráció tartomány (µg/ml)</b>
Valin	4,63–115,58
Leucin	6,31–71,42
Izoleucin	1,68–97,66
Fenilalanin	1,65–36,76
Tirozin	1,16–82,20
Triptofán	1,17–39,35
Szerotonin	0,27–1,70
Kinurenin	0,10–2,04

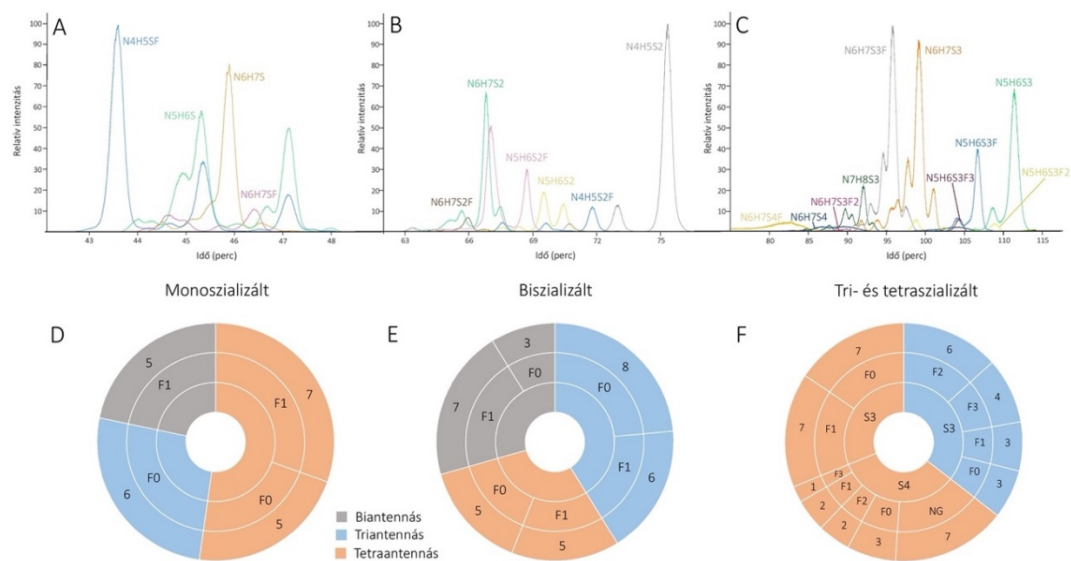
#### 4.2. Az AGP biomarker jellegének vizsgálata melanomában

##### 4.2.1. HILIC-MS/MS

A malignus melanomának az AGP glikozilációs mintázatára gyakorolt hatásával foglalkozó kutatás keretében 18 *high risk* melanomás beteg és 19 egészséges önkéntes szérummintáját dolgoztam fel. A mintákból AGP-t izoláltam, enzimatisz emésztéssel felszabadítottam a szénhidrát oldalláncokat, és antranilsavas származékokat képeztem belőlük. Ezt követően a mintákat egy újonnan kifejlesztett és optimált HILIC-MS/MS módszerrel vizsgáltam. A továbbiakban az oligoszacharidokat cukorösszetételük alapján fogom jelölni, ahol a betűk a láncot felépítő monoszacharid egységeket jelölik: H (hexóz,



amely lehet mannóz vagy galaktóz), G (galaktóz), M (mannóz), N (N-acetil-glükózamin), S (sziálsav), F (fukóz), a betűk utáni szám pedig azt jelöli, hogy az adott monoszacharidból hány található a láncban. Tekintve, hogy az AGP-ben kizárólag komplex szerkezetű oldalláncok találhatóak, amelyek *core* része konzervatív szerkezetű, két N-acetil-glükózaminból és három mannózból épül fel, belátható, hogy a N4H5 jelölés bi-, az N5H6 tri-, az N6H7 tetraantennáris, az N7H8 pedig láncelongált szerkezetre utal. Ahogy az extrahált ionkromatogramok mutatják a **8. ábrán**, az antranilsavas glikánszármazékok három, egymástól jól elkülöníthető csúcseyüttesben jelentek meg sziálsav tartalmuk alapján: 43,49–47,15 perc között az egyszeresen, 61,36–75,31 perc között a kétszeresen, 83,46–112,60 perc között a háromszorosan, illetve négyszeresen szializált szerkezetek eluálódtak. Ezekből a megfigyelésekből arra következtethetünk, hogy HILIC elválasztások során a retenciót elsősorban a láncvégi sziálsavak száma befolyásolja, míg az antennák, a fukózegységek, illetve egyéb szerkezeti sajátosságok, mint az N-acetil-glükózaminból és galaktózból álló láncelongációk, mérsékelten befolyásolják a visszatartást. Pontos tömeg alapján mintegy 102 izomert sikerült beazonosítani, amely jelenlegi tudásunk alapján az eddigi legnagyobb szám, amelyet az AGP esetében kimutattak. Ennek legfőbb oka, hogy a nagyfelbontású kromatográfias módszer lehetővé tette az olyan glikánizomerek elválasztását is, amelyek egymástól csak a sziálsav kötéstípusában ( $\alpha$ -2,3 vagy  $\alpha$ -2,6), illetve a fukóz pozíciójában (*core* vagy antenna) különböztek egymástól. A relatíve nagy feldolgozott fehérjemennyiség (mintánként kb. 2 mg), illetve az érzékeny tömegspektrometriás detektálás révén pedig a kis mennyiségben jelenlévő izomerek is azonosíthatók voltak, amelyek sok esetben a fő izomerekhez viszonyítva két-három nagyságrenddel kisebb intenzitással jelentkeztek az ionkromatogramokon. Tekintve, hogy az AGP egy szialoglikoprotein, a beazonosított izomerek mindegyike tartalmazott legalább egy sziálsav egységet, továbbá megtalálhatóak voltak egyszeresen, kétszeresen és háromszorosan fukozilált, illetve elongált láncú szerkezetek is. A **8. ábra** bemutatja a főbb komponensek extrahált ionkromatogramjait, továbbá az azonosított glikánizomerek szerkezeti megoszlását.

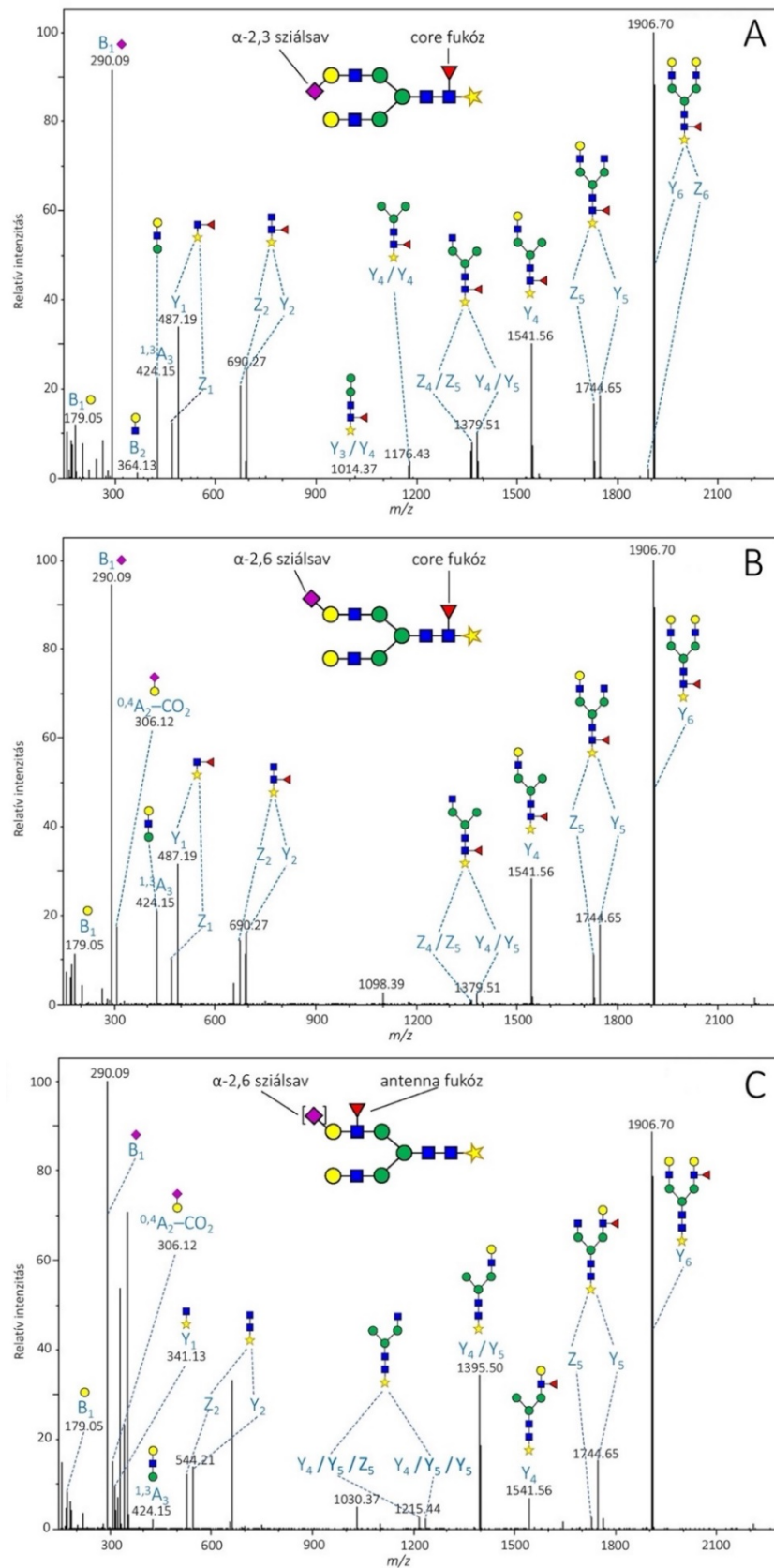


**8. ábra** A mono- (A,D), bi- (B,E), tri- és tetraszialisált (C,F) oligoszacharidok extrahált ionkromatogramjai és szerkezeti sajátágaik

*NG az N-acetil-glükózaminból és galaktózból álló lánclongációra vonatkozik. A diagrammok külső rétegében található számok bemutatják az adott oligoszacharid esetén igazolt izomerek számát.*

A tandem tömegspektrumok kiértékelése lehetővé tette a legintenzívebb 39 izomer szerkezeti jellemzését. A fragmensionokat a Domon és Costello által javasolt nomenklatúra alapján neveztem el [90]. Az optimált körülmények között az MS/MS spektrumok főként „Y”, „Z” és „B” típusú fragmensionokat tartalmaztak, de szintén megfigyelhetők voltak gyűrűhasadással keletkező „A” ionok is. A nagyszámú azonosított glikánizomer abból adódik, hogy a láncvégi szialsavak  $\alpha$ -2,3 és  $\alpha$ -2,6 kötéssel kapcsolódhatnak az oligoszacharid lánchoz, lehetővé téve az izomerek nagy szerkezeti variabilitását. Mindkét kötéstípusra jellemző diagnosztikus fragmension megfigyelhető volt az MS/MS spektrumokban, így meg lehetett állapítani, hogy az egyes izomerek melyiket tartalmazzák. Fontos megjegyezni, hogy a spektrumok szoftveres kiértékelése során az ionkromatogramok megfelelő részét kijelölve, az egyes izomerek akkor is értékelhetők voltak, ha bizonyos mértékű koelúció lépett fel közöttük. Az  $\alpha$ -2,6 kötés jelenlétének igazolására a  $^{0,4}A_2-CO_2$  (306,12  $m/z$ ) iont,  $\alpha$ -2,3-hoz pedig a  $B_2-CO_2$  (408,15  $m/z$ ) iont alkalmaztam, bár utóbbi tipikusan kis intenzitással jelentkezett a spektrumokon [91–93]. A biantennás, N4H5S2 összetételű glikán három csúcsban eluálódott 70,53 és 75,31 perc között, alapvonal elválasztással. A diagnosztikus fragmensionokkal sikerült igazolni, hogy az első izomer  $\alpha$ -2,3 szialsavat tartalmazott, a másodikban egyaránt kimutatható volt az  $\alpha$ -2,3 és az  $\alpha$ -2,6, a harmadik izomer pedig tisztán  $\alpha$ -2,6 szialisált

volt. A megfigyelések alátámasztják, hogy az izomerek elúciós sorrendje nem kizárólag a szialsavegységek számával, de a cukorláncokhoz való kapcsolódásuk módjával is szorosan összefügg, ugyanis az  $\alpha$ -2,6 szialsav nagyobb retenciót eredményez a HILIC elválasztások során, mint az  $\alpha$ -2,3. Egy másik biantennáris glikánszármazék, az N4H5SF összesen öt kromatográfiás csúcsban eluálódott 43,49 és 47,11 perc között, miközben egyetlen szialsavegységet hordoz. Az öt csúcs közül az 1., a 3., illetve az 5. volt elegendően intenzív az értékelhető MS/MS spektrumok felvételéhez, melyeket a **9. ábra** mutat be. A spektrumok alapján az 1. izomer  $\alpha$ -2,3, míg a 3. és az 5.  $\alpha$ -2,6 szializált. Az 1. izomer spektrumán fellelhető továbbá egy sorozat Y (és megfelelő Z) ionfragmens, amely *core* fukoziláció jelenlétére utal:  $Y_1$  (487,19 *m/z*),  $Y_2$  (690,27 *m/z*),  $Y_3/Y_4$  (1014,37 *m/z*) and  $Y_4/Y_4$  (1176,43 *m/z*) (**9A ábra**). A 3. izomer szintén tartalmazta  $Y_1$  és  $Y_2$  ionokat, viszont  $Y_3/Y_4$  és  $Y_4/Y_4$  nem található meg az izomer kisebb intenzitása miatt (**9B ábra**). Másrészt az 5. izomer spektrumán az  $Y_1$  (341,13 *m/z*) és  $Y_2$  (544,21 *m/z*) ionok nem tartalmazzak fukózt a megelőző két izomerrel ellentétben, mely egyértelműen antenna fukozilációra utal (**9C ábra**). Ezt erősíti az a tény is, hogy az  $Y_4/Y_5/Y_5$  (1233,45 *m/z*) és  $Y_4/Y_5$  (1395,51 *m/z*) ionfragmensek szintén fukóz nélkül jelentkeznek a spektrumon, annak ellenére hogy ezeken egyaránt megtalálható a *core* és antenna rész N-acetil-glükózamin egysége. Ennek a valószínűsíthető oka, hogy az antenna fukóz gyengébben kötődik a szacharidgerinchez, mint a *core* fukóz, tehát fragmentáció közben könnyebben lehasad arról [91,93,94]. Egy másik biantennáris glikán, a 67,93–73,50 között eluálódó N4H5S2F esetén szintén fellelhető két *core* fukozilált izomer. Tekintve, hogy ezek az izomerek egyaránt megtalálhatók az egészséges és a beteg mintákban is, kizárható, hogy a kórfolyamat eredményeként jönnek létre. Következésképpen, a jelen munka nem támogatja azokat a korábbi megfigyeléseket, miszerint az AGP kizárólag antenna fukozilált oligoszacharid oldalláncokat tartalmaz [95,96]. A **VIII.**, a **IX.** és a **X. táblázat** összefoglalja az azonosított bi-, tri- és tetraantennás glikánizomerek retenciós időit, az azonosítás tömegpontosságát, továbbá a szialsavak kötéstípusait és a fukózegységek pozícióit (ahol lehetséges).



**9. ábra** Az N4H5SF 1. (A), 3. (B) és 5. (C) izomereinek MS/MS spektruma  
*A csillag szimbólum az antranilsavat jelöli az oligoszaccharid lánc redukáló végén.*

**VIII. táblázat** Az AGP-ből azonosított biantennás glikánizomerek retenciós ideje, detektálásuk tömegpontossága és szerkezeti jellemzőik

Oligoszacharid	Izomer	Retenciós idő (perc)	Tömegpontosság (ppm)	Sziálsav kötéstípus	Fukóz-pozíció
<b>N4H5SF</b>	Izomer 1	43,49	2,57	$\alpha$ -2,3	core
	Izomer 2	44,71	-3,04	-	-
	Izomer 3	45,33	3,90	$\alpha$ -2,6	core
	Izomer 4	46,43	4,32	-	-
	Izomer 5	47,11	3,56	$\alpha$ -2,6	antenna
<b>N4H5S2</b>	Izomer 1	70,53	2,86	$\alpha$ -2,3	-
	Izomer 2	73,02	3,00	$\alpha$ -2,3, $\alpha$ -2,6	-
	Izomer 3	75,31	2,92	$\alpha$ -2,6	-
<b>N4H5S2F</b>	Izomer 1	67,93	7,40	$\alpha$ -2,3	core
	Izomer 2	69,26	13,22	-	-
	Izomer 3	69,99	8,32	$\alpha$ -2,3, $\alpha$ -2,6	core
	Izomer 4	70,60	12,73	-	-
	Izomer 5	71,16	9,39	-	-
	Izomer 6	72,28	8,57	$\alpha$ -2,3, $\alpha$ -2,6	antenna
	Izomer 7	73,50	14,75	-	-

**IX. táblázat** Az AGP-ből azonosított triantennás glikánizomerek retenciós ideje, detektálásuk tömegpontossága és szerkezeti jellemzőik

Oligoszacharid	Izomer	Retenciós idő (perc)	Tömegpontosság (ppm)	Sziálsav kötéstípus	Fukózpozíció
<b>N5H6S</b>	Izomer 1	43,94	4,07	-	-
	Izomer 2	44,90	4,16	-	-
	Izomer 3	45,27	3,86	$\alpha$ -2,6	-
	Izomer 4	46,06	5,95	-	-
	Izomer 5	46,67	4,17	$\alpha$ -2,6	-
	Izomer 6	47,11	1,79	$\alpha$ -2,6	-
<b>N5H6S2</b>	Izomer 1	65,94	1,56	-	-
	Izomer 2	66,80	2,57	-	-
	Izomer 3	67,41	2,15	-	-
	Izomer 4	68,57	0,48	$\alpha$ -2,6	-
	Izomer 5	69,39	1,41	$\alpha$ -2,6	-
	Izomer 6	70,06	2,46	$\alpha$ -2,6	-
	Izomer 7	71,13	2,51	-	-
	Izomer 8	71,72	1,94	-	-
<b>N5H6S2F</b>	Izomer 1	63,78	-4,98	-	-
	Izomer 2	66,15	-5,16	-	-
	Izomer 3	65,98	-4,87	-	-
	Izomer 4	67,62	0,02	$\alpha$ -2,6	antenna
	Izomer 5	69,32	0,48	$\alpha$ -2,6	antenna
	Izomer 6	70,92	1,01	-	-
<b>N5H6S3</b>	Izomer 1	106,35	2,74	-	-
	Izomer 2	108,49	4,05	$\alpha$ -2,6	-
	Izomer 3	111,10	1,73	$\alpha$ -2,6	-
<b>N5H6S3F</b>	Izomer 1	101,56	0,16	$\alpha$ -2,3, $\alpha$ -2,6	antenna
	Izomer 2	104,04	0,76	$\alpha$ -2,6	antenna
	Izomer 3	106,62	-3,14	-	-
<b>N5H6S3F2</b>	Izomer 1	96,54	6,62	-	-
	Izomer 2	99,08	3,39	-	-
	Izomer 3	102,40	3,61	-	-
	Izomer 4	106,30	-3,49	-	-
	Izomer 5	108,70	-4,46	-	-
	Izomer 6	112,60	0,43	-	-
<b>N5H6S3F3</b>	Izomer 1	94,10	-9,58	-	-
	Izomer 2	102,00	-8,98	-	-
	Izomer 3	104,23	-7,08	-	-
	Izomer 4	108,77	-6,81	-	-

**X. táblázat** Az AGP-ből azonosított tetraantennás glikánizomerek retenciós idői, detektálásuk tömegpontossága és szerkezeti jellemzőik

Oligoszacharid	Izomer	Retenciós idő (perc)	Tömegpontosság (ppm)	Sziálsav kötéstípus	Fukózpozíció
<b>N6H7S</b>	Izomer 1	44,44	0,97	-	-
	Izomer 2	45,06	-0,35	-	-
	Izomer 3	45,43	1,75	-	-
	Izomer 4	45,86	1,71	-	-
	Izomer 5	46,52	1,73	-	-
<b>N6H7SF</b>	Izomer 1	43,62	2,11	-	-
	Izomer 2	44,17	-1,30	-	-
	Izomer 3	44,56	8,65	-	-
	Izomer 4	44,94	4,29	-	-
	Izomer 5	45,66	2,93	-	-
	Izomer 6	46,38	2,44	-	-
	Izomer 7	47,04	6,94	-	-
<b>N6H7S2</b>	Izomer 1	63,28	4,27	-	-
	Izomer 2	65,07	4,33	-	-
	Izomer 3	65,66	3,32	-	-
	Izomer 4	66,83	3,94	$\alpha$ -2,6	-
	Izomer 5	67,54	3,97	$\alpha$ -2,6	-
<b>N6H7S2F</b>	Izomer 1	64,33	3,39	$\alpha$ -2,6	antenna
	Izomer 2	65,01	3,23	$\alpha$ -2,6	antenna
	Izomer 3	66,00	2,83	$\alpha$ -2,6	antenna
	Izomer 4	66,76	3,30	$\alpha$ -2,6	antenna
	Izomer 5	67,32	5,37	-	-
<b>N6H7S3</b>	Izomer 1	92,20	-0,91	-	-
	Izomer 2	94,31	1,65	-	-
	Izomer 3	95,87	1,07	-	-
	Izomer 4	96,76	-3,32	$\alpha$ -2,3, $\alpha$ -2,6	-
	Izomer 5	97,99	-3,50	$\alpha$ -2,3, $\alpha$ -2,6	-
	Izomer 6	99,27	-3,88	$\alpha$ -2,3, $\alpha$ -2,6	-
	Izomer 7	101,17	-2,98	$\alpha$ -2,6	-
<b>N6H7S3F</b>	Izomer 1	87,74	5,42	-	-
	Izomer 2	90,29	5,98	-	-
	Izomer 3	93,38	6,09	$\alpha$ -2,6	antenna
	Izomer 4	94,88	3,66	$\alpha$ -2,6	antenna
	Izomer 5	96,18	1,19	$\alpha$ -2,3, $\alpha$ -2,6	antenna
	Izomer 6	97,68	7,11	$\alpha$ -2,6	antenna
	Izomer 7	99,85	6,22	-	-
<b>N6H7S4</b>	Izomer 1	87,44	2,87	$\alpha$ -2,6	-
	Izomer 2	89,74	-3,40	-	-
	Izomer 3	103,90	-2,97	-	-
<b>N6H7S4F</b>	Izomer 1	83,46	1,81	-	-
	Izomer 2	93,77	3,25	-	-
<b>N6H7S4F2</b>	Izomer 1	99,39	3,67	-	-
	Izomer 2	108,76	5,36	-	-
<b>N6H7S4F3</b>	Izomer 1	90,15	-3,56	-	-
<b>N7H8S3</b>	Izomer 1	85,61	-1,5	-	-
	Izomer 2	88,24	4,83	-	-
	Izomer 3	90,28	1,73	-	-
	Izomer 4	91,09	-1,17	-	-
	Izomer 5	92,49	-1,44	$\alpha$ -2,6	-
	Izomer 6	93,73	-1,49	$\alpha$ -2,6	-
	Izomer 7	95,27	-5,03	-	-

A kutatás eredeti célkitűzései között szerepelt olyan rendellenes szerkezetű oligoszacharidok (izomerek) azonosítása, amelyek csak a kóros mintákban fordulnak elő, így biomarkerként szolgálhatnak. A minták spektrumainak részletes kiértékelése során azonban nem találtam ilyen szerkezetet, és a mintaelőkészítésből adódó intenzitáskülönbséggel függ össze, hogy nem minden mintában sikerült azonosítani az összes izomert. Ennek megfelelően a továbbiakban a glikozilációs mintázat relatív mennyiségi változásaira koncentráltam. Annak érdekében, hogy a kórfolyamat hatására bekövetkező potenciális változások értékelhetők legyenek, továbbá kiküszöböljem a mintaelőkészítésből adódó intenzitáskülönbségeket, meghatároztam minden glikánizomer csúcs alatti területét az egyéni mintákban, majd kifejeztem az adott mintában található összes oligoszacharidhoz viszonyított relatív mennyiségüket. Az adatkomplexitás további csökkentése, illetve a vizualizáció elősegítése céljából az értékeket átlagoltam beteg és a kontrollcsoportban is, majd a betegcsoport értékeit normalizáltam a kontrollcsoportra. Végül indokoltnak láttam kihagyni az összehasonlításból azokat az izomereket, melyek nem voltak értékelhetők minden egyéni mintában. Az összehasonlításba így bekerült 52 izomer normalizált relatív mennyiségeit mutatja be az **10. ábra**. Ez alapján egyértelműen látható a fukozilált oligoszacharidok túlexpressziója a melanomás csoportban, különösen a jobban elágazó szerkezetek esetén. Néhány triantennás (N5H6S3F, N5H6S3F2, N5H6S3F3) és tetraantennás (N6H7S4F, N6H7S4F2) glikánizomer példáján pedig az is belátható, hogy a növekedés mértéke hozzávetőlegesen arányban van a szénhidrát lánchoz kapcsolódó fukózegységek számával, jól demonstrálva a fukoziláció kitüntetett szerepét a kórfolyamatban. Valószínűleg az előző folyamat eredményeként, néhány nem fukozilált glikán (N5H6S2, N5H6S3, N6H7S3) relatív mennyiségi csökkenése is megfigyelhető a betegcsoportban. Egy adott oligoszacharid különböző izomereit összehasonlítva arányeltolódás figyelhető meg a később eluálódó komponens javára. A jelenség leginkább a triantennás N5H6S2 és N5H6S3F, továbbá a tetraantennás N6H7S2 és N6H7S2F esetén jelentkezett. Összhangban a szializált izomerek elúciós sorrendjéről levont következtetésekkel, az N5H6S3F és N6H7S2 esetén MS/MS kísérletekkel igazolható volt, hogy a jelenség az  $\alpha$ -2,6 szializáció fokozott mértékével függ össze, ahogy azt korábban megfigyelték [71,94]. Bár a melanoma hatására végbemenő és a glikozilációs mintázatban megfigyelhető változások egyértelmű tendenciát mutatnak, a nagy inter-individuális különbségek miatt



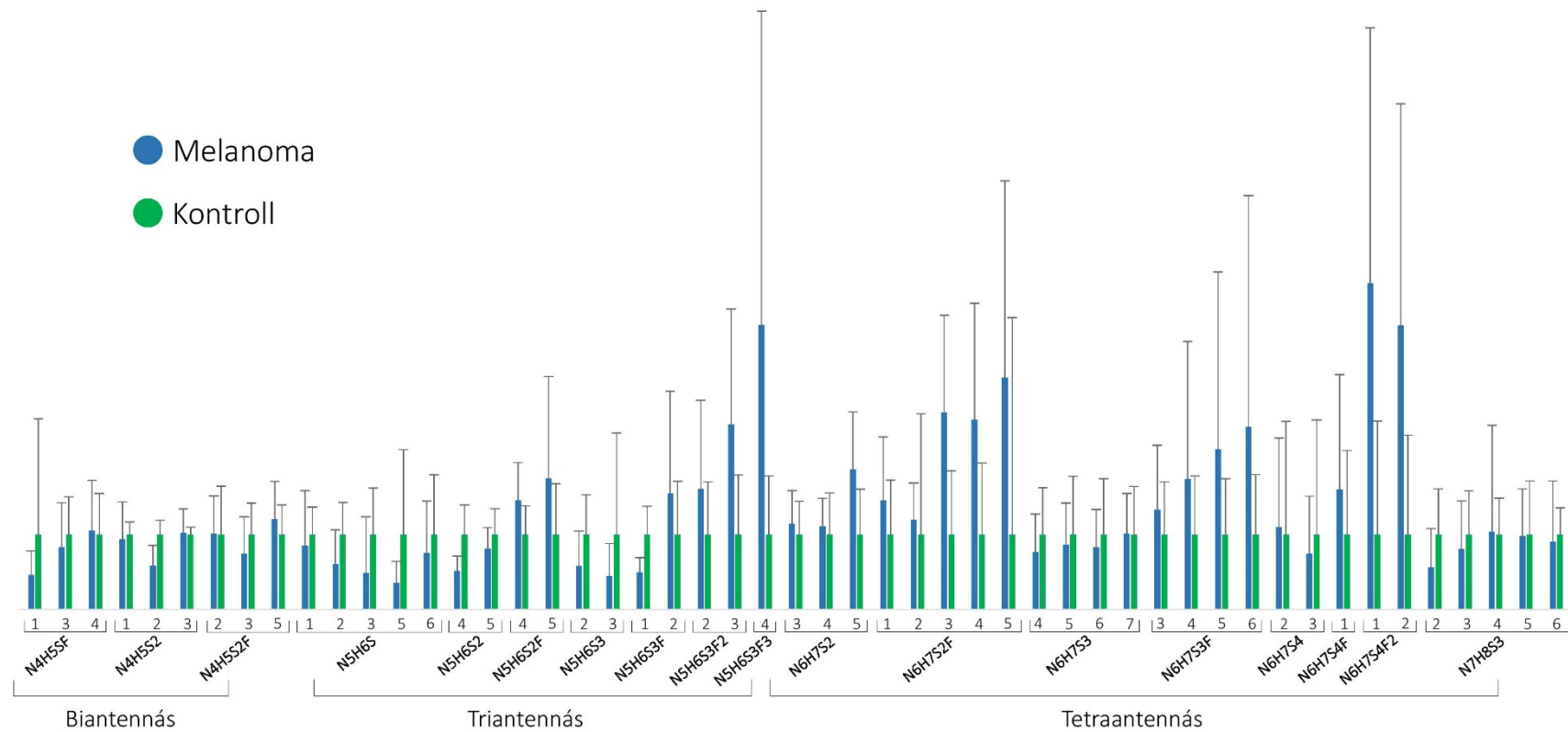
(lásd a **10. ábra** oszlopdiagramján a relatív szórás értékek) nem azonosítható olyan karakterisztikus változás, mely önmagában olyan biztonsággal képes kategorizálni az egyéni mintákat, hogy az alkalmas lehet a diagnózis támogatására. Indokoltnak tűnt tehát olyan kemometriai módszer keresése és alkalmazása, amely a változásokat kombinálva képes a glikozilációs mintázat felismerésére, és a klasszifikációs hatékonyság növelésére.

#### 4.2.2. Statisztikai analízis

Az LC-MS mérések eredményeit lineáris diszkriminancia analízissel (LDA) értékeltem ki, amely folytonos független változók lineáris kombinációját alkalmazva, képes megkülönböztetni kettő vagy több kategóriát, mint függő változót [98]. Az AGP glikozilációs mintázatában bekövetkező változások ismeretében, a független változók keresése közben három típusú mennyiséget vettem figyelembe: 1) egy glikán, tehát egy adott oligoszacharid összes izomerének relatív mennyisége az adott mintában jelenlévő összes szénhidrát viszonylatában, 2) egy adott glikánizomer relatív mennyisége, 3) egy adott glikán izomereinek egymáshoz viszonyított aránya. Általános szabály az LDA esetében, hogy a független változók száma nem haladhatja meg az összes minta egyharmadát (esetünkben 12-t), máskülönben felléphet az alacsony mintaszám problémája [69,98]. Ezenfelül a legnagyobb diszkrimináló képességgel rendelkező változókat kell kiválasztani annak érdekében, hogy megvalósuljon a kategóriák lehető legnagyobb mértékű elkülönülése. Ezt az úgynevezett Fisher index (F) kiszámításával érhetjük el:

$$3. \text{ képlet} \quad F = \frac{(m_{kontroll} - m_{melanoma})^2}{v_{kontroll} + v_{melanoma}}$$

ahol  $m$  az adott csoport értékeinek átlaga,  $v$  pedig a szórásnégyzete. Minél nagyobb tehát  $F$  értéke, az adott változó annál jobban képes diszkriminálni a kategóriák között. Ahogy a **XI. táblázat** bemutatja, a tíz legnagyobb  $F$  értékkel rendelkező változó mindössze négy oligoszachariddal függ össze.



**10. ábra** Relatív csúcsterület átlagok a beteg és a kontrollcsoportban

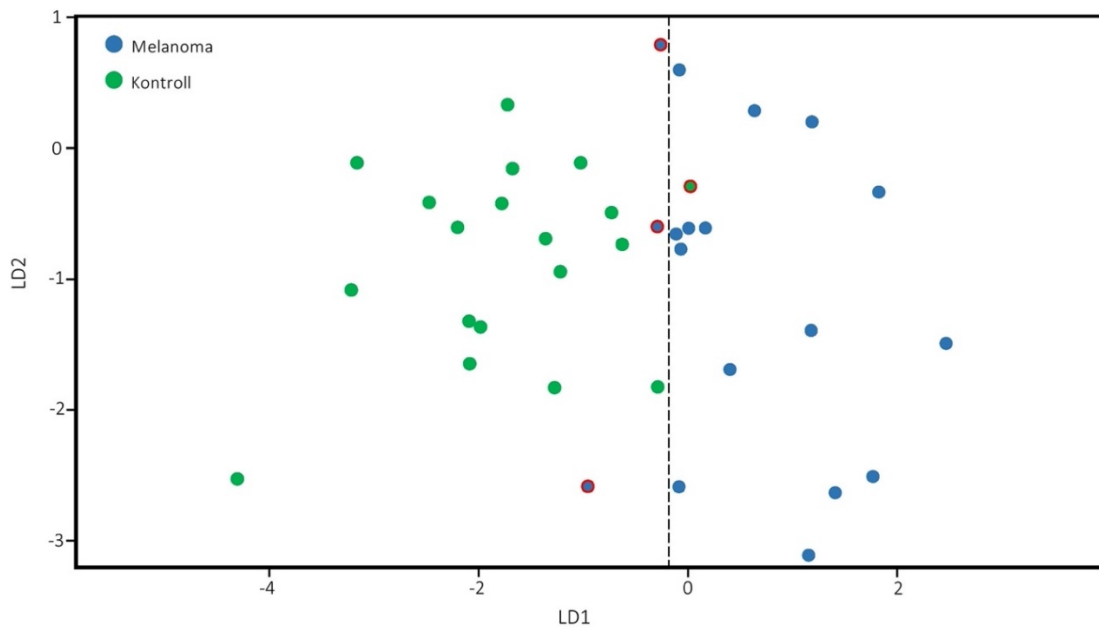
*A beteg csoport értékei átlagolva a kontrollcsoportra.*

Az értékek megerősítik azokat az észrevételeket miszerint bizonyos fukozilált szerkezetek túlexpressziója (N6H7S2F,  $F=0,85$ ), illetve nem fukozilált szerkezetek alulexpressziója (N5H6S2,  $F=0,99$ ) kulcsszerepet játszik a beteg illetve kontrollminták megkülönböztetésében. Megfigyelhető továbbá, hogy ugyanazon glikán különböző izomerei nem egyenlő mértékben képesek differenciálni a kategóriák között, ugyanis N5H6S2 4. ( $F=1,20$ ) és 5. ( $F=0,46$ ) izomere, továbbá N6H7S2F 3. izomere ( $F=0,98$ ) magasabb F értéket adott, mint a többi izomer. Ugyanazon oligoszacharid izomerei között megfigyelhető arányeltolódás (amelynél több esetben sikerült igazolni, hogy az  $\alpha$ -2,6 szializáció fokozott mértékével függ össze), szintén magas Fisher indexeket eredményezett. Ez legfőképp N5H6S2 4. és 5. ( $F=0,74$ ), N5H6S3F 1. és 2. ( $F=0,27$ ), N6H7S2 3. és 5. ( $F=1,12$ ), valamint 4. és 5. ( $F=0,97$ ), továbbá N6H7S2F 2. és 3. izomere ( $F=1,23$ ) esetében volt a legnagyobb mértékű.

**XI. táblázat** A klasszifikációban legjelentősebb oligoszacharidok, a diszkrimináló faktorok, a változás iránya és megfelelő Fisher indexek

Oligoszacharid	Diszkrimináló faktor	Változás melanomában	Fisher index
<b>N5H6S2</b>	Izomer 4/Izomer 5	↓	0,74
	Izomer 4	↓	1,20
	Izomer 5	↓	0,46
	Összes izomer	↓	0,99
<b>N5H6S3F</b>	Izomer 1/izomer 2	↓	0,27
<b>N6H7S2</b>	Izomer 3/izomer 5	↓	1,12
	Izomer 4/izomer 5	↓	0,97
<b>N6H7S2F</b>	Izomer 2/izomer 3	↓	1,23
	Izomer 3	↑	0,98
	Összes izomer	↑	0,85

A **11. ábra** mutatja be a tíz független változóval elvégzett lineáris diszkriminancia analízis eredményét. A pontdiagrammon megfigyelhető, hogy a modell képes volt jól elkülöníteni egymástól a beteg és a kontrollcsoportot, kis átfedés azonban megfigyelhető, mely eredményeként a modell három melanomás mintát kontrollként, egy kontrollmintát pedig melanomásként azonosított. Ezek alapján a modell klasszifikációs hatékonysága 89,2%.



**11. ábra** A 37 klinikai minta klasszifikációja lineáris diszkriminancia analízissel

*Zöld szín jelöli a kontroll, kék a melanomás mintákat, a vörös körvonal pedig a helytelen osztályzást.*

A független változók modellre gyakorolt hatását szintén vizsgáltam. Ennek során tíz alkalommal újraképeztem az LDA modellt úgy, hogy mindig kihagytam egy változót. Ez minden esetben rontotta a módszer elválasztóképességét, mely tipikusan a daganatos minták kontrollként való felismerésében nyilvánult meg. Következésképpen mind a tíz független változó fontos szerepet játszik a módszer eredményességében. Fontos megjegyezni, hogy újabb változó bevezetése (melynek Fisher indexe értelemszerűen alacsonyabb, mint a modellhez felhasznált tíz változóé) nem vezetett eredményesebb klasszifikációhoz. Értékeltem továbbá a modell teljesítményét, az ún. „egyharmad-kihagyásos” kereszt-validálási módszerrel. Ennek során a 37 vizsgálati minta véletlenszerűen kiválasztott kétharmadából (25 minta) megalkottam a modellt, a

visszamaradó egyharmadra (12 minta) pedig ismeretlenként tekintetem, és kategorizáltam őket a modell alapján. A ciklust tíz alkalommal ismételt meg, összesen 120 véletlenszerűen kiválasztott minta besorolását elvégezve. A módszer 55 melanomás mintából 52-t, és 65 kontrollmintából 64-et helyesen ismert fel, mely kimagasló, 96,7%-os klasszifikációs hatékonyságot jelent.

#### 4.2.3. Az AGP biomarker jellegének értékelése

A biomarkerek értékelését az alábbi teljesítményjelzőkkel lehet elvégezni: érzékenység, specifikusság, pozitív prediktív érték, negatív prediktív érték [99].

Az érzékenység megadja annak a valószínűségét, hogy az elvégzett diagnosztikus próba pozitív eredményt mutat olyan egyénnél, akinél valóban fennáll a kórállapot, tehát a betegség azonosításának megbízhatóságát:

$$4. \text{ képlet} \quad \text{érzékenység} = \frac{\text{valódi pozitív}}{\text{valódi pozitív} + \text{fals negatív}}$$

A specifikusság annak a valószínűségét fejezi ki, hogy a teszt eredménye negatív lesz olyan egyénnél, akinél nem áll fenn a kórállapot, tehát azt, hogy milyen megbízhatóan azonosítja az adott betegségben nem szenvedő egyéneket:

$$5. \text{ képlet} \quad \text{specifikusság} = \frac{\text{valódi negatív}}{\text{valódi negatív} + \text{fals pozitív}}$$

A pozitív prediktív érték megmutatja, hogy pozitív próba esetén mekkora a valószínűsége, hogy valóban fennáll a betegség, tehát a pozitív teszteredmény megbízhatóságáról szolgáltat információt:

$$6. \text{ képlet} \quad \text{pozitív prediktív érték} = \frac{\text{valódi pozitív}}{\text{valódi pozitív} + \text{fals pozitív}}$$

A negatív prediktív érték azt mutatja meg, hogy negatív próba esetén mekkora annak a valószínűsége, hogy valóban nem áll fenn a kórállapot, tehát a negatív teszteredmény megbízhatóságáról ad tájékoztatást:

$$7. \text{ képlet} \quad \text{negatív prediktív érték} = \frac{\text{valódi negatív}}{\text{valódi negatív} + \text{fals negatív}}$$

A teljesítményjelzők értékeit kiszámítottam az LDA modell alapján kapott eredményekre, a kereszt-validálás eredményeire, továbbá a korábban már említett, a melanoma diagnosztikában jelenleg alkalmazott S100B fehérje szérumkoncentrációkra (**XII. táblázat**). A bőrgyógyászati gyakorlat alapján, utóbbinál 0,15 µg/l-es határértéket vettem figyelembe. Ekkor azt tapasztaltam, hogy 19 kontroll egyénből 18-nál határérték alatt volt, 18 melanomás betegből viszont csak 6 esetén volt emelkedett az érték. A biomarkerek összevetése során azt tapasztaljuk, hogy bár az S100B specifikus, és magas pozitív prediktív értékkel rendelkezik, az AGP magasan felülmúlta azt érzékenység és negatív prediktív érték tekintetében. Következésképpen, az itt bemutatott eredmények alapján az AGP glikozilációs mintázata hatékonyabb biomarkerként szolgálhat a malignus melanoma diagnosztikájában, mint az S100B fehérje.

**XII. táblázat** A biomarkerek teljesítményjelzői a vizsgált populációban

	Érzékenység (%)	Specifikusság (%)	Pozitív prediktív érték (%)	Negatív prediktív érték (%)
S100B fehérje	33,3	94,7	85,7	60,0
AGP	83,3	94,7	94,7	85,7
AGP kereszt-validálás	94,6	98,5	98,1	95,5

## 5. Megbeszélés

### 5.1. Migrén-biomarkerek kvantitatív analízise vérplazmából

Az aminosavak mennyiségi meghatározásának jelentős szakirodalma van mind növényi, állati és humán eredetű biológiai mintákban [100–102]. Jelenlegi tudásom szerint azonban nem közöltek eddig olyan módszert, mely aminosavak, szerotonin és kinurenin egymás melletti kvantitatív meghatározását tette lehetővé vérplazmából, vagy más biológiai közegből. Az aminosavakat nagyon gyakran derivatizálják annak érdekében, hogy elősegítsék kromatográfiás elválasztásukat és javítsák a detektálás érzékenységét [102,103]. A származékképzés azonban nem kívánt interferenciák forrása lehet, nehezítve a módszer validálását, továbbá jelentősen növeli a mintaelőkészítés munka és időigényét [103]. Az analitok megfelelően érzékeny és szelektív detektálását a tömegspektrométer MRM módban való működtetésével, és az MRM paraméterek (ütközési energia, fragmentor feszültség) optimalizálásával biztosítottam. A vizsgálatok során beigazolódott, hogy a készülékérzékenységből adódó LLOQ értékeket sikerült olyan alacsony értékre beállítani, hogy az egyes analitokra nézve legkisebb koncentrációjú minták mérése is sikeres volt. További nehézséget jelentett a mintaelőkészítés és kromatográfiás elválasztás optimalizálásakor a meghatározni kívánt analitok koncentráció tartományában jelentkező jelentős különbség. A szerotonin és kinurenin, aminosavakénál jóval alacsonyabb várható plazma koncentrációja volt alapvetően a szűk keresztmetszet, tehát nem volt lehetőség a kiindulási mintamennyiség csökkentésére a mintaelőkészítés során. A leucin és izoleucin esetén azonban mind a molekulatömeg, mind az MRM tömegátmenet azonosnak adódott, tehát a tömegspektrométer nem biztosítja a két anyag szelektív meghatározását. Hasonló fizikokémiai tulajdonságaik miatt, a két anyag között gyakran koelúció lép fel, ezért sok kutatás a leucint és az izoleucint együtt kezeli, és összmennyiségüket határozza meg. A nagy mintaszám miatt kutatócsoportunk törekedett elkerülni mind a származékképzést, mind a hosszabb gradiens elúciós módszereket. A kromatográfiás kolonna helyes megválasztásával sikerült izokratikus körülmények között is megvalósítani az izomerek elválasztását, mely a héjszerkezetű töltet csökkent anyagátadási ellenállásának, és az így megnövekedett hatékonyságának is köszönhető.

A biomarkerkutatások térnyerésével egyre nagyobb igény jelentkezik endogén anyagok kvantitatív meghatározására alkalmas módszerek fejlesztésére és validálására.

Az igény azonban sokáig reflektálatlanul maradt a szabályozást végző hatóságok részéről (EMA, FDA), melyek irányelvei elsősorban a gyógyszervegyületek és azok metabolitjainak bioanalitikai meghatározására, továbbá a módszervalidálás kritériumaira fókuszált, teret engedve a *fit for purpose* kvantitálási/validálási stratégiák elterjedésének. Tekintve, hogy a bevezetésben ismertetett négy megközelítés rendelkezik előnyökkel és hátrányokkal is, kiválasztásukat nagyban befolyásolja az adott analitikai feladat. Jelen kutatás esetében, ahol a cél nagyszámú egyéni minta meghatározása, melyekből viszonylag kis mennyiség áll rendelkezésre (~1,5 ml vagy kevesebb), a standard addíció alkalmazását korlátozza, hogy a minták részletekre osztva, többszöri mérést igényelnek. Migrénes egyéneknél az analitok egy részének csökkent plazmakoncentrációjával kell számolnunk. A háttérkivonás módszerénél így előfordulhat, hogy a kontrollmátrix által meghatározott LLOQ érték alá kell extrapolálni, ahol a kalibrációs egyenes linearitásáról nincs információnk, így szisztematikus hibával terhelt a mérési eredményt, ezért alkalmazása kerülendő. Bár a helyettesítő analit megközelítés széles körben elfogadott, analitonként két stabilizotóp jelzett BST-t igényel. Esetünkben ez 16 standard beszerzését igényelte volna, nagymértékben emelve a mérések költségeit, és a jelzett standardok korlátozott elérhetősége miatt nem is bizonyult megvalósíthatónak. Választásom ezért esett a helyettesítő mátrix módszerére, mellyel kis laborintenzitás mellett megvalósítható több analit széles koncentrációtartományban történő meghatározása, nagyszámú egyéni mintában. Az eljárás potenciális hátránya a szisztematikus hiba, melyet a biológiai és a helyettesítő mátrix közötti parallelizmus hiánya okoz. Ezért fontos a helyettesítő mátrix összetételének gondos megválasztása, mely az analitokra vonatkoztatott mátrixhatás és extrakciós hatások szempontjából is reprezentálja a biológiai mintát. Szakirodalmi adatok alapján leggyakrabban PBS-ben oldott HSA-t alkalmaznak a vérplazma helyettesítésére, így én is ezt választottam. Az elővizsgálatok során aktív szénnel kezelt poolozott plazmával is végeztem kísérleteket, de nem sikerült maradéktalanul analitmentesíteni a plazmát, továbbá az eredmények reprodukálhatatlannak bizonyultak. A mesterséges plazma alkalmazhatóságát mindkét rendelkezésre álló módszerrel, standard addícióval és hígítási integritás vizsgálatokkal is értékeltem. Mindkét vizsgálat a mátrixok parallelizmusát mutatta, bizonyítva, hogy az összetétel reprezentálja a vérplazmát. Fontos kiemelni, hogy ez az állítás csak a vizsgálataim tárgyát képező analitokra igaz, s bár ezek a tapasztalatok erősítik a választott helyettesítő mátrix



széleskörű alkalmazhatóságát – melyet számos irodalmi adat támaszt alá-, új módszerek validálása esetén külön értékelni kell [104–107]. A mesterséges mátrix tehát alkalmazhatónak bizonyult a kalibrációs és QC minták elkészítésére. Tekintve, hogy a mátrix analitmentes közeget biztosít, az irányelvekben foglalt összes QC szint elkészíthető benne. Ennek ellenére a validálás és az egyéni minták mérésének teljes ideje alatt, egy ötödik, poolozott plazmából készített QC mintát is használtam a parallelizmus további értékelése céljából, melynek koncentrációját standard addícióval határoztam meg. Bár a bemutatott bioanalitikai módszer a helyettesítő mátrix megközelítésen alapul, a módszer validálás több pontján kihasználtam a standard addíciós módszer előnyeit is. Érdekes tehát a *fit for purpose* stratégiákat nem egymástól élesen elhatárolt módszerekként kezelni, hanem úgy tekinteni rájuk, mint a bioanalitikai eszköztár elemeire, melyek tetszőlegesen kombinálhatók annak érdekében, hogy a validálási kritériumok maradéktalanul teljesüljenek. Bár a kutatás célkitűzéseinek megfogalmazása, és a projekt lebonyolítása idején még nem állt rendelkezésre, a Nemzetközi Egységesítési Konferencia (*International Conference on Harmonization*, ICH), - mely az Európai Unió, az Egyesült Államok és Japán szabályozási rendszerét hivatott összehangolni - 2019-ben megjelenő irányelv-tervezetében említést tesz az endogén anyagok meghatározásának kihívásairól, illetve a *fit for purpose* stratégiákról, mellyel nagy lépést tesz annak irányában, hogy a hasonló kutatások egy jól szabályozott hatósági környezetben valósuljanak meg a jövőben [108].

## 5.2. Az AGP biomarker jellegének vizsgálata melanomában

Az AGP szénhidrát összetételének megváltozása a glikoziláción alapuló biomarkerkutatások gyakori tárgyát képezi, különösen daganatos betegségek esetén, melyek korai felismerése kiemelt jelentőségű. A jól alkalmazható szűrési és diagnosztikus célú biomarkerek hozzájárulhatnak ehhez, valamint a terápia sikeréhez. Az AGP-re irányuló kutatások módszertana meglehetősen szerteágazó, de általános tendencia, hogy az intakt fehérje és a glikopeptid szintű vizsgálatokkal szemben, előnyben részesítik felszabadított glikán szintű vizsgálatokat. Saját tapasztalataimat figyelembe véve, ennek valószínűsíthető oka, hogy bár a glikoziláció helyspecifikus változásáról nem ad információt, az elválasztástechnikai módszer (kromatográfia vagy kapilláris elektroforézis) képes sokkal jobban elválasztani a (derivatizált) oligoszacharidokat, mint a glikopeptideket, részletesebb információt szolgáltatva az

izomerek számáról és szerkezetéről. Ahogy azt jelen kutatás alátámasztja, a glikánizomerek felbontása fontos szerepet játszott a daganatos és kontrollminták megkülönböztetésében, tekintve, hogy a legnagyobb F értékű független változók mind izomerszintű megfigyelésen alapultak.

Érdeemes kitérni rá, hogy a kutatás eredeti célkitűzése az AGP biomarker jellegének vizsgálata volt malignus melanomában, melyet sikerült egyértelműen igazolni a vizsgált populációban. Ehhez olyan egyének mintáit használtam fel, akiknek a primer tumortömeg alapján betegségük előrehaladott állapotban volt (pT3 és pT4 stádium), de áttéttel nem rendelkeztek. A vizsgált betegpopulációban az S100B fehérje koncentrációja csak 33,3%-ban jelezte a betegséget, az AGP viszont 83,3%-ban, a kereszt-validálás során pedig az arány ennél is magasabbnak adódott (94,6%). Ez alapján valószínűsíthető, hogy az AGP a betegség korai stádiumaiban (pT1, pT2) is képes az S100B-től jobb érzékenységgel kimutatni a kórképet, de természetesen ennek meghatározása további vizsgálatokat, validálást igényel.

A validálási procedúra során a biomarker jelöltet lényegesen nagyobb és heterogénebb populációban vizsgálják, mint egy *pilot study*-ban. A folyamat részét képezi, hogy az egészséges önkéntesek mellett bevonnak a kutatásba a vizsgált kórképpel valamilyen módon összefüggő egyéb betegségben szenvedő egyéneket, pl. olyanokat, akik valamilyen más (bőr)daganatos betegségben szenvednek. Abban az esetben, ha a biomarker nem reprezentálja megfelelően a betegséget, a fals pozitív esetek számának növekedése miatt, a specifikusság és a pozitív prediktív érték csökkenését tapasztaljuk. Bár az AGP melanoma markerként történő validálása még nem zajlott le, a szakirodalmi adatok, és kutatócsoportunk korábbi vizsgálatai alapján bizonyos következtetéseket le tudunk vonni a kis számú, hasonló módszertanú vizsgálatok alapján. A jelen munka előzményeként is felfogható kutatásban, Imre és munkatársai az AGP oligoszacharid oldalláncainak antranilsavas származékait vizsgálta MALDI-TOF MS technikával (*matrix assisted laser desorption ionization – time of flight*). A vizsgálatba 12 egészséges önkéntest, 16 ovárium tumoros és 15 limfómás beteget vontak be. A 34 azonosított glikán csúcshintenzitásait lineáris diszkriminancia analízissel kiértékelve három tetraantennás (N6H7S3, N6H7S4, N6H7S4F), két láncelandógt tetraantennás (N7H8S3F, N7H8S4F2), továbbá két dupla láncelandógt tartalmazó tetraantennás szerkezetnél (N8H9S3F, N8H9S4F) találtak jelentős diszkrimináló képességet, mellyel a módszer képes volt 88%-

os klasszifikációs hatékonyság mellett besorolni a mintákat [69]. Kisszámú (3) bazálsejtes karcinómás betegtől gyűjtött mintán végzett vizsgálataink során pedig kutatócsoportunk azt tapasztalta, hogy bizonyos glikánok esetén (N5H6S2, N5H6S3F, N6H7S2) épp ellentétes irányú folyamatok zajlottak le, mint melanoma malignumban, és az LDA eredményeit bemutató pontdiagrammon a kontroll és melanomás mintáktól jól elhatárolódva jelentek meg, lehetővé téve azok megkülönböztetését. Mancera-Artu és munkatársai szintén AGP oligoszacharidok relatív mennyiségi változásait vizsgálta dukális adenokarcinómás (19), krónikus hasnyálmirigy gyulladással betegekben (6), és egészséges önkénteseken (5). Az anilinnel származékolt oldalláncokat zwitterionos hidrofil kölcsönhatású kromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriával (ZIC-HILIC-MS) vizsgálták, és az eredményeket parciális legkisebb négyzet-diszkriminancia analízissel értékelték ki. Ekkor azt találták, hogy a minták megkülönböztetésében három triantennás (N5H6S2F, N5H6S3, N5H6S3F2), két tetraantennás (N6H7S2F, N6H7S3F2), illetve egy elongált láncú szerkezet (N7H8S4F) játszott a legnagyobb szerepet [72]. Ha összevetjük a különböző munkák eredményeit, azt tapasztaljuk, hogy a biomarker jellegű oligoszacharidok között egyáltalán nincs átfedés a különböző betegségekben. Ezek az eredmények erősítik azt az elképzelést, hogy a daganatos betegségekben észlelhető megváltozott glikoziláció erősen specifikus a daganat biztosította mikrokozonyra, hozzájárulva a kiváló specificitással (és pozitív prediktív értékkel) rendelkező, glikoziláció alapú biomarkerek kifejlesztéséhez [61].

## 6. Következtetések

Doktori munkám egyik fő célkitűzése egy LC-MS/MS alapú bioanalitikai módszer kifejlesztése volt nyolc kismolekulás anyag vérplazmából történő meghatározására, mint a valin, leucin, izoleucin, fenilalanin, tirozin, triptofán, szerotonin és kinurenin. A mintaelőkészítés fehérjekicsapással történt. Izokratikus körülmények között végzett RP-HPLC-s módszerrel 6,5 perc alatt megvalósult a komponensek elúciója, és az izomer aminosavak (leucin, izoleucin) elválasztása. Az analitok MRM módban történő detektálása lehetővé tette érzékeny és szelektív meghatározásukat, más mátrixkomponensből származó interferencia nem jelentkezett a kromatogramokon. Az analitok endogén természetéből adódóan a bioanalitikai módszervalidálásra vonatkozó hatósági irányelvek csak korlátozottan alkalmazhatók, melyek előírják, hogy a validálási mintákat a vizsgálati mintákkal azonos mátrixban kell elkészíteni. A nagyszámú analit és meghatározni kívánt vérplazma minta miatt, a helyettesítő mátrix megközelítést alkalmaztam a probléma megoldására. Ennek során 4% HSA tartalmú PBS oldatot alkalmaztam a kalibráló és minőségellenőrző minták elkészítésére. A vérplazma és a mesterséges mátrix közötti parallelizmust vizsgáltam standard addíciós módszerrel, és hígítási integritás vizsgálattal. Az eredmények azt mutatták, hogy a mátrixok közötti párhuzamosság fennáll minden analit esetén. Következésképp, a kiválasztott összetétel megfelelően reprezentálja a vérplazmát a mérendő komponensek esetében, mind extrakciós határfok, mind mátrixhatás tekintetében. A módszer továbbá lehetővé tette a *quality control* minták elkészítését, az irányelvek által előírt összes koncentráció szinten. Így lehetőség nyílt a kifejlesztett módszer validálására az EMA és FDA által meghatározott összes paraméterre. A validált módszert sikerrel alkalmaztam a nyolc analit meghatározására 800 humán vérplazma mintában, egy migrén biomarkerekre irányuló kutatás támogatása céljából.

Doktori kutatásom másik részében az AGP glikozilációs profilját vizsgáltam malignus melanomában, mely betegségnek jelenleg nincs érdemi, szűrési és diagnosztikus célú biomarkere. A 18 *high-risk* melanomás beteg, és 19 egészséges önkéntes bevonásával végzett klinikai kutatásban, a glikozilációs mintázatban három jellemző változás volt megfigyelhető: bizonyos fukozilált szerkezetek felszaporodása, nem fukozilált szerkezetek alulexpressziója, továbbá az  $\alpha$ -2,6 szializáció mértékének fokozódása. Nem sikerült azonban olyan szerkezetet azonosítani, mely kizárólag az egyik

mintatípusban (daganatos vagy kontroll) van jelen, esetleg mennyiségi változása önmagában megbízhatóan jelezne a betegséget. Ez valószínűleg annak tudható be, hogy a számottevő individuális különbségek nagy csoporton belüli szórást eredményeznek, s bár az értékek átlagából a tendenciák egyértelműen kiolvashatók, a mintákat egyénileg vizsgálva nem jelentenek előrelépést az S100B fehérjéhez képest, diagnosztikus értékben. A mintázatfelismerésre széles körben alkalmazott statisztikai módszerrel, a lineáris diszkriminancia analízissel viszont jelentős előrelépést sikerült elérni ezen a téren. A módszer lehetővé tette a csoportok megkülönböztetését leginkább elősegítő két triantennás (N5H6S2, N5H6S3F) és két tetraantennás (N6H7S2, N6H7S2F) oligoszacharid, illetve a hozzájuk köthető független változók azonosítását. Annak ismeretében, hogy a tíz legnagyobb Fisher indexszel rendelkező változó közül nyolc izomer szintű megfigyelésen alapul, a biomarker jelleg eredményes igazolásához nélkülözhetetlennek bizonyult a nagy felbontóképességű elválasztástechnikai módszer (esetünkben a HILIC módszer), mellyel megvalósítható az izomerek elválasztása. Másik fontos tapasztalat, hogy az egyes változók önmagukban nem, kombinálva viszont kiemelkedő klasszifikációs hatékonyságot eredményeztek. Fontos tanulság tehát, hogy a glikozilációra irányuló biomarker-vizsgálatoknak célravezető nem egyedi szerkezeteket monitoroznia, hanem a teljes mintázatot figyelembe vennie. Ez alapján az ilyen irányú kutatások szerves részét kell képeznie a mintázatfelismerésre alkalmas biostatistikai módszereknek, mellyel tapasztalataim alapján leküzdhető a nagy egyéni különbségek zavaró hatása, illetve a változások olyan egyedi kombinációja található meg, mely nagy specifikusságot mutat a vizsgált kórképre. Ezzel a megközelítéssel sikerült igazolnom az AGP glikozilációs mintázatának biomarker jellegét *high-risk* melanomás betegekben. A vizsgált populációban a biomarker felülmúlta az S100B fehérjét, különösen érzékenységi és negatív prediktív érték tekintetében. Az eredmények ismeretében egyértelműen indokoltnak látszik a vizsgálatok folytatása, és a validálás megkezdése. Reményeim szerint ezzel a kutatással sikerült lefektetni az alapjait egy, a jelenleginél hatékonyabb szerológiai biomarkernek, amely eredményesen járulhat hozzá a malignus melanoma diagnosztikájának támogatásához.

## 7. Összefoglalás

A doktori munkám első részében kidolgoztam egy LC-MS/MS alapú bioanalitikai módszert, mely alkalmas kinurenin és szerotonin, aminosavak (valin, leucin, izoleucin, tirozin, triptofán) melletti meghatározására vérplazmából. Az eljárás lehetővé teszi az izomer aminosavak (leucin, izoleucin) szeparálását, valamint a nagy koncentrációkülönbségek ellenére, az anyagok kvantitatív meghatározását. Az egyszerű mintaelőkészítés, a kalibrációs módszer megfelelő megválasztása, és a nagyfelbontású kromatográfias elválasztás MS/MS méréssel való kapcsolásából adódóan, a módszer alkalmas volt nagyszámú plazmaminta elemzésére. A validálást az endogén anyagok mennyiségi meghatározásának „*fit for purpose*” megközelítése alapján, a helyettesítő mátrix módszer és standard addíció megfelelő kombinálásával végeztem, mely lehetővé tette a módszer és a mérés teljeskörű validálását. A vizsgálat során kapott koncentráció adatok hozzájárultak a migrén patomechanizmusának mélyebb megértésére irányuló átfogó klinikai kutatáshoz.

Doktori kutatásom második felében egy HILIC-MS/MS módszert dolgoztam ki az AGP szénhidrát tartalmának antranilsavas származékképzést követő vizsgálatára, mely a nagyfelbontású kromatográfias módszernek köszönhetően lehetővé tette az eddigi kutatásoknál nagyobb számú glikánizomer azonosítását. A módszerrel 18 *high-risk* melanomás beteg, és 19 egészséges önkéntes szérumból izolált AGP glikozilációs mintázatát vizsgáltam. Jellemeztem a betegség glikozilációs profilra gyakorolt hatását, illetve két triantennás (N5H6S2, N5H6S3F) és két tetraantennás (N6H7S2, N6H7S2F) oligoszacharidot, valamint hozzájuk kapcsolódó változókat, melyek leginkább alkalmasak voltak a beteg és kontrollcsoport közötti különbségtételre lineáris diszkriminancia analízis módszerével. Igazoltam az AGP glikozilációs mintázatának biomarker jellegét *high-risk* melanomás betegeken, mely mind érzékenységben, mind negatív prediktív értékben messze fölülmúlja a jelenleg alkalmazott S100B biomarkert. A vizsgálatok során kapott eredmények alapján kijelenthető, hogy a kidolgozott és alkalmazott analitikai és kemometriai módszerek összessége alapját képezheti egy jövőbeni, hatékony melanoma malignum diagnosztikai eljárásnak.

## 8. Summary

In the first part of my doctoral research, I developed an LC-MS/MS based bioanalytical method for the simultaneous determination of serotonin and kynurenin with amino acids (valine, leucine, isoleucine, tyrosine and tryptophan) in human plasma. The procedure was able to separate isomeric amino acids (leucine, isoleucine) as well as to determine the analytes quantitatively, despite the significant differences in their concentrations. The simple sample preparation procedure, the proper selection of the calibration method, and the high resolution chromatographic method in combination with the MS/MS measurements enabled the analysis of a large number of samples. Validation of the analytical method was carried out based on the so-called "fit-for-purpose" approach combining authentic analyte in surrogate matrix and standard addition method resulting in a successful validation of the method. The concentration data obtained from this study supported a comprehensive clinical study focusing on the more in-depth understanding of the pathomechanism of migraine disorder.

In the second part of my doctoral research, I developed a HILIC-MS/MS method for the analysis of anthranilic acid derivatives of oligosaccharides released from AGP. The method enabled the identification of the highest number of isomers ever detected in AGP, which is primarily due to the high resolution chromatographic method. The method was applied for the measurement of serum AGP obtained from 18 high-risk melanoma malignant patients and 19 healthy control individuals. I discovered how the disease affects the glycosylation profile of AGP, and identified two triantennary (N5H6S2, N5H6S3F) and two tetraantennary (N6H7S2, N6H7S2F) oligosaccharides with their related variables being the most meaningful to differentiate between malignant and control samples. I verified that the glycosylation pattern of AGP can serve as a biomarker for high-risk malignant melanoma that is superior to S100B protein in terms of sensitivity and negative predictive value. Based on the results presented here, it can be stated that the set of analytical and chemometric methods developed and applied can serve as a basis of a future, effective diagnostic procedure for malignant melanoma.

**Irodalomjegyzék**

1. Amur, S. Food and Drug Administration. Biomarker Terminology: Speaking the Same Language. <https://www.fda.gov/files/BIOMARKER-TERMINOLOGY--SPEAKING-THE-SAME-LANGUAGE.pdf> (2021. 05. 12.)
2. FDA-NIH Biomarker Working Group (2016) *BEST (Biomarkers, EndpointS, and Other Tools) Resource*; Food and Drug Administration (US): Silver Spring (MD).
3. Robb, M.A.; McInnes, P.M.; Califf, R.M. (2016) Biomarkers and Surrogate Endpoints: Developing Common Terminology and Definitions. *JAMA* 315, 1107–1108.
4. What Is a Biomarker? Lippincott NursingCenter, 2019. <https://www.nursingcenter.com/ncblog/november-2019/biomarker> (2021 07. 21.).
5. Fleming, T.R.; Powers, J.H. (2012) Biomarkers and Surrogate Endpoints In Clinical Trials. *Stat Med*, 31, 2973–2984.
6. Berns, B.; Démolis, P.; Scheulen, M.E. (2007) How Can Biomarkers Become Surrogate Endpoints? *European Journal of Cancer Supplements* 5, 37–40.
7. Vékey, K., Telekes, A., Vértés, Á. (2008) *Medical Applications of Mass Spectrometry*. Elsevier, Amsterdam, 505-531.
8. King, L.; Jurima-Romet, M.; Ichhpurani, N. (2020) *Biomarkers in Drug Discovery and Development*; John Wiley & Sons, Hoboken (NJ), 485-504.
9. Baumgartner, C.; Osl, M.; Netzer, M.; Baumgartner, D. (2011) Bioinformatic-Driven Search for Metabolic Biomarkers in Disease. *Journal of Clinical Bioinformatics* 1, 2.
10. Hilario, M.; Kalousis, A.; Prados, J.; Binz, P.-A. (2004) Data Mining for Mass-Spectra Based Diagnosis and Biomarker Discovery. *Drug Discovery Today: BIOSILICO* 2, 214–222.
11. Jian, W.; Edom, R.W.; Weng, N. (2012) Important Considerations for Quantitation of Small-Molecule Biomarkers Using LC-MS. *Bioanalysis* 4, 2431–2434.



12. European Medicines Agency (2011) Guideline on Bioanalytical Method Validation. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf) (2021. 06. 02.)
13. Food and Drug Administration (2018) Bioanalytical Method Validation, Guidance for Industry. <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf> (2021. 06. 02.)
14. Huang, Y.; Louie, A.; Yang, Q.; Massenkoff, N.; Xu, C.; Hunt, P.W.; Gee, W. (2013) A Simple LC-MS/MS Method for Determination of Kynurenine and Tryptophan Concentrations in Human Plasma from HIV-Infected Patients. *Bioanalysis* 5, 1397–1407.
15. Jiang, J.; James, C.A.; Wong, P. (2016) Bioanalytical Method Development and Validation for the Determination of Glycine in Human Cerebrospinal Fluid by Ion-Pair Reversed-Phase Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 128, 132–140.
16. Lai, X.; Kline, J.A.; Wang, M. (2015) Development, Validation, and Comparison of Four Methods to Simultaneously Quantify l-Arginine, Citrulline, and Ornithine in Human Plasma Using Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography and Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *J Chromatogr B* 1005, 47–55.
17. van de Merbel, N.C.; Bronsema, K.J.; van Hout, M.W.J.; Nilsson, R.; Sillén, H. (2011) A Validated Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for the Quantitative Determination of 4 $\beta$ -Hydroxycholesterol in Human Plasma. *J Pharm Biomed Anal* 55, 1089–1095.
18. Shi, Y.; Xu, X.; Fang, M.; Zhang, M.; Li, Y.; Gillespie, B.; Yorke, S.; Yang, N.; McKew, J.C.; Gahl, W.A.; Huizing, M.; Carrillo-Carrasco, N; Wang, A.Q. (2015) Quantitative Hydrophilic Interaction Chromatography-Mass Spectrometry Analysis of N-Acetylneuraminic Acid and N-Acetylmannosamine in Human Plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1000, 105–111.

19. Wang, A.-Q.; Wei, B.-P.; Zhang, Y.; Wang, Y.-J.; Xu, L.; Lan, K. (2011) An Ultra-High Sensitive Bioanalytical Method for Plasma Melatonin by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Using Water as Calibration Matrix. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 879, 2259–2264.
20. Thakare, R.; Chhonker, Y.S.; Gautam, N.; Alamoudi, J.A.; Alnouti, Y. (2016) Quantitative Analysis of Endogenous Compounds. *J Pharm Biomed Anal*, 128, 426–437.
21. Baser, M. (1980) A Systematic Approach to Standard Addition Methods in Instrumental Analysis *J Chem Educ* 57, 703-706.
22. Gachet, M.S.; Rhyn, P.; Bosch, O.G.; Quednow, B.B.; Gertsch, J. (2015) A Quantitative LC-MS/MS Method for the Measurement of Arachidonic Acid, Prostanoids, Endocannabinoids, N-Acylethanolamines and Steroids in Human Plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 976–977, 6–18.
23. Bathena, S.P.; Huang, J.; Epstein, A.A.; Gendelman, H.E.; Boska, M.D.; Alnouti, Y (2012) Rapid and Reliable Quantitation of Amino Acids and Myo-Inositol in Mouse Brain by High Performance Liquid Chromatography and Tandem Mass Spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 893–894, 15–20.
24. Jones, B.R.; Schultz, G.A.; Eckstein, J.A.; Ackermann, B.L. (2012) Surrogate Matrix and Surrogate Analyte Approaches for Definitive Quantitation of Endogenous Biomolecules. *Bioanalysis* 4, 2343–2356.
25. Jemal, M.; Schuster, A.; Whigan, D.B. (2003) Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Methods for Quantitation of Mevalonic Acid in Human Plasma and Urine: Method Validation, Demonstration of Using a Surrogate Analyte, and Demonstration of Unacceptable Matrix Effect in Spite of Use of a Stable Isotope Analog Internal Standard. *Rapid Commun Mass Spectrom* 17, 1723–1734.
26. Ahmadkhaniha, R.; Shafiee, A.; Rastkari, N.; Khoshayand, M.R.; Kobarfard, F. (2010) Quantification of Endogenous Steroids in Human Urine by Gas Chromatography Mass Spectrometry Using a Surrogate Analyte Approach. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 878, 845–852.

27. Han, J.; Liu, Y.; Wang, R.; Yang, J.; Ling, V.; Borchers, C.H. (2015) Metabolic Profiling of Bile Acids in Human and Mouse Blood by LC–MS/MS in Combination with Phospholipid-Depletion Solid-Phase Extraction. *Anal Chem* 87, 1127–1136.
28. Montuschi, P.; Martello, S.; Felli, M.; Mondino, C.; Chiarotti, M. (2004) Ion Trap Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Analysis of Leukotriene B4 in Exhaled Breath Condensate. *Rapid Commun Mass Spectrom* 18, 2723–2729.
29. Owen, D.H.; Katz, D.F. (2005) A Review of the Physical and Chemical Properties of Human Semen and the Formulation of a Semen Simulant. *J Androl* 26, 459–469.
30. Owen, D.H.; Katz, D.F. A Vaginal Fluid Simulant. *Contraception* 1999, 59, 91–95.
31. Zhang, D.; Rios, D.R.; Tam, V.H.; Chow, D.S.-L. (2014) Development and Validation of a Highly Sensitive LC–MS/MS Assay for the Quantification of Arginine Vasopressin in Human Plasma and Urine: Application in Preterm Neonates and Child. *J Pharm Biomed Anal* 99, 67–73.
32. Steiner, C.; von Eckardstein, A.; Rentsch, K.M. (2010) Quantification of the 15 Major Human Bile Acids and Their Precursor 7 $\alpha$ -Hydroxy-4-Cholesten-3-One in Serum by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 878, 2870–2880.
33. Tanaka, T.; Hayashi, Y. (1986) Determination of Silicon, Calcium, Magnesium and Phosphorus in Urine Using Inductively-Coupled Plasma Emission Spectrometry and a Matrix-Matching Technique. *Clin Chim Acta* 156, 109–113.
34. Mirejovsky, D.; Patel, A.S.; Rodriguez, D.D.; Hunt, T.J. (1991) Lipid Adsorption onto Hydrogel Contact Lens Materials. Advantages of Nile Red over Oil Red O in Visualization of Lipids. *Optom Vis Sci* 68, 858–864.
35. Mashru, R.C.; Sutariya, V.B.; Sankalia, M.G.; Parikh, P.P. (2005) Development and Evaluation of Fast-Dissolving Film of Salbutamol Sulphate. *Drug Dev Ind Pharm* 31, 25–34.
36. Oka, K.; Yamamoto, M.; Nonaka, T.; Tomonaga, M. (1996) The Significance of Artificial Cerebrospinal Fluid as Perfusate and Endoneurosurgery. *Neurosurgery* 38, 733–736.

37. Karlsen, A.; Blomhoff, R.; Gundersen, T.E. (2005) High-Throughput Analysis of Vitamin C in Human Plasma with the Use of HPLC with Monolithic Column and UV-Detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 824, 132–138.
38. Goadsby, P.J.; Holland, P.R.; Martins-Oliveira, M.; Hoffmann, J.; Schankin, C.; Akerman, S. (2017) Pathophysiology of Migraine: A Disorder of Sensory Processing. *Physiol Rev* 97, 553–622.
39. Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS) (2018) The International Classification of Headache Disorders, 3rd Edition. *Cephalalgia* 38, 1–211.
40. Deen, M.; Christensen, C.E.; Hougaard, A.; Hansen, H.D.; Knudsen, G.M.; Ashina, M. (2017) Serotonergic Mechanisms in the Migraine Brain - a Systematic Review. *Cephalalgia* 37, 251–264.
41. Juhasz, G.; Zsombok, T.; Modos, E.A.; Olajos, S.; Jakab, B.; Nemeth, J.; Szolcsanyi, J.; Vitrai, J.; Bagdy, G. (2003) NO-Induced Migraine Attack: Strong Increase in Plasma Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) Concentration and Negative Correlation with Platelet Serotonin Release. *Pain* 106, 461–470.
42. Guedes, R.C.A.; Araújo, M. das G.R. de; Verçosa, T.C.; Bion, F.M.; de Sá, A.L.; Pereira, A.; Abadie-Guedes, R. (2017) Evidence of an Inverse Correlation between Serotonergic Activity and Spreading Depression Propagation in the Rat Cortex. *Brain Res* 1672, 29–34.
43. Drummond, P.D. (2006) Tryptophan Depletion Increases Nausea, Headache and Photophobia in Migraine Sufferers. *Cephalalgia* 26, 1225–1233.
44. Fernstrom, J.D. (2013) Large Neutral Amino Acids: Dietary Effects on Brain Neurochemistry and Function. *Amino Acids* 45, 419–430.
45. Young, S.N. (2013) Acute Tryptophan Depletion in Humans: A Review of Theoretical, Practical and Ethical Aspects. *J Psychiatry Neurosci* 38, 294–305.
46. Tóth F.; Fülöp F.; Szatmári I.; Toldi J.; Dékány I.; Vécsei L. (2020) Kinureninek és gyógyszerkutatás. *OH* 161, 443–451.

47. Hoche pied, T.; Berger, F.G.; Baumann, H.; Libert, C. (2003) Alpha(1)-Acid Glycoprotein: An Acute Phase Protein with Inflammatory and Immunomodulating Properties. *Cytokine Growth Factor Rev* 14, 25–34.
48. Yuasa, I.; Umetsu, K.; Vogt, U.; Nakamura, H.; Nanba, E.; Tamaki, N.; Irizawa, Y. (1997) Human Orosomucoid Polymorphism: Molecular Basis of the Three Common ORM1 Alleles, ORM1\*F1, ORM1\*F2, and ORM1\*S. *Hum Genet* 99, 393–398.
49. Budai, L.; Ozohanics, O.; Ludányi, K.; Drahos, L.; Kremmer, T.; Krenyacz, J.; Vékey, K. (2009) Investigation of Genetic Variants of Alpha-1 Acid Glycoprotein by Ultra-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 393, 991–998.
50. Luo, Z.; Lei, H.; Sun, Y.; Liu, X.; Su, D.-F. (2015) Orosomucoid, an Acute Response Protein with Multiple Modulating Activities. *J Physiol Biochem* 71, 329–340.
51. Ferens-Sieczkowska, M.; Kowalska, B.; Kratz, E.M. (2013) Seminal Plasma Glycoproteins in Male Infertility and Prostate Diseases: Is There a Chance for Glyco-Biomarkers? *Biomarkers* 18, 10–22.
52. Shibata, Y.; Tamura, K.; Ishida, N. (1984) Cultured Human Monocytes, Granulocytes and a Monoblastoid Cell Line (THP-1) Synthesize and Secrete Immunosuppressive Acidic Protein (a Type of  $\alpha_1$ -Acid Glycoprotein). *Microbiol Immunol* 28, 99–111.
53. Nakamura, T.; Board, P.G.; Matsushita, K.; Tanaka, H.; Matsuyama, T.; Matsuda, T. (1993) Alpha 1-Acid Glycoprotein Expression in Human Leukocytes: Possible Correlation between Alpha 1-Acid Glycoprotein and Inflammatory Cytokines in Rheumatoid Arthritis. *Inflammation* 17, 33–45.
54. Gahmberg, C.G.; Andersson, L.C. (1978) Leukocyte Surface Origin of Human Alpha1-Acid Glycoprotein (Orosomucoid). *Journal of Experimental Medicine* 148, 507–521.
55. Molnárné Szöllősi, É. (2007) A humán szérum  $\alpha_1$ -savanyú glikoprotein oligoszachrid szerkezetének vizsgálata. Doktori disszertáció. Eötvös Lóránd Tudományegyetem.

56. Flower, D.R.; North, A.C.; Sansom, C.E. (2000) The Lipocalin Protein Family: Structural and Sequence Overview. *Biochim Biophys Acta* 1482, 9–24.
57. Lögdberg, L.; Wester, L. (2000) Immunocalins: A Lipocalin Subfamily That Modulates Immune and Inflammatory Responses. *Biochim Biophys Acta* 1482, 284–297.
58. Kushner, I. (1982) The Phenomenon of the Acute Phase Response. *Ann N Y Acad Sci* 389, 39–48.
59. Ganz, P.A.; Shell, W.E.; Tökés, Z.A. (1983) Evaluation of a Radioimmunoassay for Alpha 1-Acid Glycoprotein to Monitor Therapy of Cancer Patients. *J Natl Cancer Inst* 71, 25–30.
60. Virág, D.; Dalmadi-Kiss, B.; Vékey, K.; Drahos, L.; Klebovich, I.; Antal, I.; Ludányi, K. (2020) Current Trends in the Analysis of Post-Translational Modifications. *Chromatographia* 83, 1–10.
61. Thomas, D.; Rathinavel, A.K.; Radhakrishnan, P. (2021) Altered Glycosylation in Cancer: A Promising Target for Biomarkers and Therapeutics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1875, 188464.
62. Freeze, H.H. (2006) Genetic Defects in the Human Glycome. *Nat Rev Genet* 7, 537–551.
63. Liu, D.; Gao, Z.; Yue, L. (2019) Fucosyltransferase 8 Deficiency Suppresses Breast Cancer Cell Migration by Interference of the FAK/Integrin Pathway. *Cancer Biomark* 25, 303–311.
64. Häuselmann, I.; Borsig, L. (2014) Altered Tumor-Cell Glycosylation Promotes Metastasis. *Front Oncol* 4, 28.
65. Pan, S.; Liu, Y.; Liu, Q.; Xiao, Y.; Liu, B.; Ren, X.; Qi, X.; Zhou, H.; Zeng, C.; Jia, L. (2019) HOTAIR/MiR-326/FUT6 Axis Facilitates Colorectal Cancer Progression through Regulating Fucosylation of CD44 via PI3K/AKT/MTOR Pathway. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1866, 750–760.

66. Yoshimura, M.; Nishikawa, A.; Ihara, Y.; Taniguchi, S.; Taniguchi, N. (1995) Suppression of Lung Metastasis of B16 Mouse Melanoma by N-Acetylglucosaminyltransferase III Gene Transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8754–8758.
67. Radhakrishnan, P.; Grandgenett, P.M.; Mohr, A.M.; Bunt, S.K.; Yu, F.; Chowdhury, S.; Hollingsworth, M.A. (2013) Expression of Core 3 Synthase in Human Pancreatic Cancer Cells Suppresses Tumor Growth and Metastasis. *Int J Cancer* 133, 2824–2833.
68. Kremer, J.M.; Wilting, J.; Janssen, L.H. (1988) Drug Binding to Human Alpha-1-Acid Glycoprotein in Health and Disease. *Pharmacol Rev* 40, 1–47.
69. Imre, T.; Kremmer, T.; Héberger, K.; Molnár-Szöllosi, E.; Ludányi, K.; Pócsfalvi, G.; Malorni, A.; Drahos, L.; Vékey, K. (2008) Mass Spectrometric and Linear Discriminant Analysis of N-Glycans of Human Serum Alpha-1-Acid Glycoprotein in Cancer Patients and Healthy Individuals. *J Proteomics* 71, 186–197.
70. Zhang, D.; Huang, J.; Luo, D.; Feng, X.; Liu, Y.; Liu, Y. (2017) Glycosylation Change of Alpha-1-Acid Glycoprotein as a Serum Biomarker for Hepatocellular Carcinoma and Cirrhosis. *Biomark Med* 11, 423–430.
71. Yokobori, T.; Yazawa, S.; Asao, T.; Nakazawa, N.; Mogi, A.; Sano, R.; Kuwano, H.; Kaira, K.; Shirabe, K. (2019) Fucosylated  $\alpha$  1 -Acid Glycoprotein as a Biomarker to Predict Prognosis Following Tumor Immunotherapy of Patients with Lung Cancer. *Sci Rep* 9, 14503.
72. Mancera-Artu, M.; Giménez, E.; Balmaña, M.; Barrabés, S.; Albiol-Quer, M.; Fort, E.; Peracaula, R.; Sanz-Nebot, V. (2019) Multivariate Data Analysis for the Detection of Human Alpha-Acid Glycoprotein Aberrant Glycosylation in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *J Proteomics* 195, 76–87.
73. Matthews, N.H.; Li, W.-Q.; Qureshi, A.A.; Weinstock, M.A.; Cho, E. (2017) *Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy*; Codon Publications, Brisbane.

74. Watts, C.G.; Dieng, M.; Morton, R.L.; Mann, G.J.; Menzies, S.W.; Cust, A.E. (2015) Clinical Practice Guidelines for Identification, Screening and Follow-up of Individuals at High Risk of Primary Cutaneous Melanoma: A Systematic Review. *Br J Dermatol* 172, 33–47.
75. Braeuer, R.R.; Watson, I.R.; Wu, C.-J.; Mobley, A.K.; Kamiya, T.; Shoshan, E.; Bar-Eli, M. (2014) Why Is Melanoma so Metastatic? *Pigment Cell Melanoma Res* 27, 19–36.
76. Guy, G.P.; Machlin, S.R.; Ekwueme, D.U.; Yabroff, K.R. (2015) Prevalence and Costs of Skin Cancer Treatment in the U.S., 2002–2006 and 2007–2011. *Am J Prev Med* 48 183–187.
77. Gershenwald, J.E.; Scolyer, R.A.; Hess, K.R.; Sondak, V.K.; Long, G.V.; Ross, M.I.; Lazar, A.J.; Faries, M.B.; Kirkwood, J.M.; McArthur, G.A.; Haydu, L.E.; Eggermont, A.M.M.; Flaherty, K.T.; Balch, C.M.; Thompson, J.F. (2017) Melanoma Staging: Evidence-Based Changes in the American Joint Committee on Cancer Eighth Edition Cancer Staging Manual. *CA Cancer J Clin* 67, 472–492.
78. Ferris, L.K.; Saul, M.I.; Lin, Y.; Ding, F.; Weinstock, M.A.; Geller, A.C.; Yuan, J.-M.; Neuren, E.; Maddukuri, S.; Solano, F.X.; Kirkwood, J.M. (2017) A Large Skin Cancer Screening Quality Initiative: Description and First-Year Outcomes. *JAMA Oncol* 3, 1112–1115.
79. Abbas, O.; Miller, D.D.; Bhawan, J. (2014) Cutaneous Malignant Melanoma: Update on Diagnostic and Prognostic Biomarkers. *Am J Dermatopathol* 36, 363–379.
80. Gebhardt, C.; Lichtenberger, R.; Utikal, J. (2016) Biomarker value and pitfalls of serum S100B in the follow-up of high-risk melanoma patients. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 14, 158-164.
81. Harpio, R.; Einarsson, R. (2004) S100 Proteins as Cancer Biomarkers with Focus on S100B in Malignant Melanoma. *Clin Biochem* 37, 512–518.
82. Zaenker, P.; Lo, J.; Pearce, R.; Cantwell, P.; Cowell, L.; Lee, M.; Quirk, C.; Law, H.; Gray, E.; Ziman, M. (2018) A Diagnostic Autoantibody Signature for Primary Cutaneous Melanoma. *Oncotarget* 9, 30539–30551.



83. Schadendorf, D.; Flaherty, K.T.; Duncan, L.M.; Kashani-Sabet, M.; Ugurel, S. (2019) *Cutaneous Melanoma*, Springer International Publishing, Berlin, 1–32.
84. Vécsei, L.; Szalárdy, L.; Fülöp, F.; Toldi, J. (2013) Kynurenines in the CNS: Recent Advances and New Questions. *Nat Rev Drug Discov* 12, 64–82.
85. Houghton, R.; Horro Pita, C.; Ward, I.; Macarthur, R. (2009) Generic Approach to Validation of Small-Molecule LC-MS/MS Biomarker Assays. *Bioanalysis* 1, 1365–1374.
86. Kremmer, T.; Boldizsár, M.; Kovács, J.; Paulik, E.; Bencsik, K.; Szajáni, B. (1995) Determination and Analysis of Human Serum Alpha-1-Acid Glycoprotein by Liquid Chromatographic Methods. *J Liquid Chromatogr* 18, 1207–1218.
87. Elliott, M.A.; Elliott, H.G.; Gallagher, K.; McGuire, J.; Field, M.; Smith, K.D. (1997) Investigation into the Concanavalin A Reactivity, Fucosylation and Oligosaccharide Microheterogeneity of Alpha 1-Acid Glycoprotein Expressed in the Sera of Patients with Rheumatoid Arthritis. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 688, 229–237.
88. Anumula, K.R.; Du, P. (1999) Characterization of Carbohydrates Using Highly Fluorescent 2-Aminobenzoic Acid Tag Following Gel Electrophoresis of Glycoproteins. *Anal Biochem* 275, 236–242.
89. Virág, D.; Király, M.; Drahos, L.; Édes, A.E.; Gecse, K.; Bagdy, G.; Juhász, G.; Antal, I.; Klebovich, I.; Dalmadi Kiss, B.; Antal, I.; Ludányi, K. (2020) Development, Validation and Application of LC-MS/MS Method for Quantification of Amino Acids, Kynurenine and Serotonin in Human Plasma. *J Pharm Biomed Anal* 180.
90. Domon, B.; Costello, C.E. (1988) A Systematic Nomenclature for Carbohydrate Fragmentations in FAB-MS/MS Spectra of Glycoconjugates. *Glycoconjugate J* 5, 397–409.
91. Wheeler, S.F.; Harvey, D.J. (2000) Negative Ion Mass Spectrometry of Sialylated Carbohydrates: Discrimination of N-Acetylneuraminic Acid Linkages by MALDI-TOF and ESI-TOF Mass Spectrometry. *Anal Chem* 72, 5027–5039.

92. Marie, A.-L.; Ray, S.; Lu, S.; Jones, J.; Ghiran, I.; Ivanov, A.R. (2021) High-Sensitivity Glycan Profiling of Blood-Derived Immunoglobulin G, Plasma, and Extracellular Vesicle Isolates with Capillary Zone Electrophoresis-Mass Spectrometry. *Anal Chem* 93, 1991–2002.
93. Mancera-Arteu, M.; Giménez, E.; Barbosa, J.; Peracaula, R.; Sanz-Nebot, V. (2017) Zwitterionic-Hydrophilic Interaction Capillary Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry for the Characterization of Human Alpha-Acid-Glycoprotein N-Glycan Isomers. *Anal Chim Acta* 991, 76–88.
94. Ács, A.; Ozohanics, O.; Vékey, K.; Drahos, L.; Turiák, L. (2018) Distinguishing Core and Antenna Fucosylated Glycopeptides Based on Low-Energy Tandem Mass Spectra. *Anal Chem* 90, 12776–12782.
95. Nwosu, C.; Yau, H.K.; Becht, S. (2015) Assignment of Core versus Antenna Fucosylation Types in Protein N-Glycosylation via Procainamide Labeling and Tandem Mass Spectrometry. *Anal Chem* 87, 5905–5913.
96. Nakano, M.; Kakehi, K.; Tsai, M.-H.; Lee, Y.C. (2004) Detailed Structural Features of Glycan Chains Derived from A1-Acid Glycoproteins of Several Different Animals: The Presence of Hypersialylated, O-Acetylated Sialic Acids but Not Disialyl Residues. *Glycobiology* 14, 431–441.
97. Raval, G.N.; Parekh, L.J.; Patel, D.D.; Jha, F.P.; Sainger, R.N.; Patel, P.S. (2004) Clinical Usefulness of Alterations in Sialic Acid, Sialyl Transferase and Sialoproteins in Breast Cancer. *Indian J Clin Biochem* 19, 60–71.
98. Tharwat, A.; Gaber, T.; Ibrahim, A.; Hassanien, A.E. (2017) Linear Discriminant Analysis: A Detailed Tutorial. *AI Communications* 30, 169–190.
99. Biomarker Assessment – What to Be Aware Of. <https://acutecaretesting.org/en/articles/biomarker-assessment--what-to-be-aware-of> (2021. 04. 12.).
100. Zheng, N.; Xiao, H.; Zhang, Z.; Gao, X.; Zhao, J. (2017) Rapid and Sensitive Method for Determining Free Amino Acids in Plant Tissue by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Acta Geochim* 36, 680–696.

101. Dhillon, M.K.; Kumar, S.; Gujar, G.T. (2014) A Common HPLC-PDA Method for Amino Acid Analysis in Insects and Plants. *Indian J Exp Biol* 52, 73–79.
102. Sharma, G.; Attri, S.V.; Behra, B.; Bhisikar, S.; Kumar, P.; Tageja, M.; Sharda, S.; Singhi, P.; Singhi, S. (2014) Analysis of 26 Amino Acids in Human Plasma by HPLC Using AQC as Derivatizing Agent and Its Application in Metabolic Laboratory. *Amino Acids* 46, 1253–1263.
103. Pawliszyn, J. (2012) *Handbook of Solid Phase Microextraction*. Elsevier, Amsterdam, 291-334.
104. Basit, A.; Piomelli, D.; Armirotti, A. (2015) Rapid Evaluation of 25 Key Sphingolipids and Phosphosphingolipids in Human Plasma by LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem* 407, 5189–5198.
105. Ghassabian, S.; Griffiths, L.; Smith, M.T. (2015) A Novel Fully Validated LC-MS/MS Method for Quantification of Pyridoxal-5'-Phosphate Concentrations in Samples of Human Whole Blood. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1000, 77–83.
106. Zhang, S.W.; Jian, W.; Sullivan, S.; Sankaran, B.; Edom, R.W.; Weng, N.; Sharkey, D. (2014) Development and Validation of an LC-MS/MS Based Method for Quantification of 25 Hydroxyvitamin D2 and 25 Hydroxyvitamin D3 in Human Serum and Plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 961, 62–70.
107. Jiang, H.; Hsu, F.-F.; Farmer, M.S.; Peterson, L.R.; Schaffer, J.E.; Ory, D.S.; Jiang, X. (2013) Development and Validation of LC-MS/MS Method for Determination of Very Long Acyl Chain (C22:0 and C24:0) Ceramides in Human Plasma. *Anal Bioanal Chem* 405, 7357–7365.
108. International Conference on Harmonization (2019) M10 on Bioanalytical Method Validation. <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m10-bioanalytical-method-validation> (2021. 07. 12.)

## Saját publikációk jegyzéke

### Az értekezés témájában megjelent közlemények

1. Virág D, Dalmadi-Kiss B, Vékey K, Drahos L, Klebovich I, Antal I, Ludányi K. (2020) Current Trends in the Analysis of Post-translational Modifications. *Chromatographia*, 83: 1-10.

IF: 2,044

2. Virág D, Király M, Drahos L, Édes AE, Gecse K, Bagdy G, Juhász G, Antal I, Klebovich I, Dalmadi Kiss B, Ludányi K. (2020) Development, validation and application of LC–MS/MS method for quantification of amino acids, kynurenine and serotonin in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 180: 113018.

IF: 3,935

3. Virág D, Kremmer T, Lőrincz K, Kiss N, Jobbágy A, Bozsányi S, Gulyás L, Wikonkál N, Schlosser G, Borbély A, Huba Z, Dalmadi Kiss B, Antal I, Ludányi K. (2021) Altered Glycosylation of Human Alpha-1-acid Glycoprotein as a Biomarker for Malignant Melanoma. *Molecules*, 26: 6003.

IF: 4,411

### **Egyéb közlemények**

1. Virág D, Dalmadiné Kiss B, Vékey K, Drahos L, Antal I, Klebovich I, Ludányi K. (2016) Biológiai gyógyszerek analitikai vonatkozásai és tömegspektrometriás vizsgálata. *Acta Pharm. Hungarica*, 86: 141-150.
2. Klebovich I, Virág D. (2018) Tracking the Effect of Drug Interactions with *In Vitro* Dissolution Studies. *Pharma Times*, 50: 16-20.
3. Dalmadiné Kiss B, Király M, Virág D, Antal I, Ludányi K. (2021) mRNS alapú vakcinák a COVID-19 járvány elleni küzdelemben. *Gyógyszerészet*, 65: 138-144.

### **Köszönetnyilvánítás**

Szeretnék hálás köszönetet mondani Prof. Antal Istvánnak, hogy doktori kutatásomat a Semmelweis Egyetem Gyógyszerészeti Intézetében végezhettem, és Dr. Ludányi Krisztinának, hogy témavezetőként egyengette utam az elmúlt években. Hálával tartozom belső konzulensemnek, Prof. Klebovich Imrének, Dalmadiné Dr. Kiss Borbálának és Prof. Kremmer Tibornak a rengeteg támogató segítségért, amit nyújtottak számomra. Szeretnék köszönetet mondani a Gyógyszerészeti Intézet minden munkatársának, elsősorban Biczók Gabriellának és Dr. Király Mártonnak a közös munkáért és jó hangulatban töltött laborgyakorlatokért. Köszönöm a Semmelweis Egyetem Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinika munkatársainak a közös transzlációs kutatási projekt megvalósítását. Szeretnék köszönetet mondani Dr. Drahos Lászlónak, Dr. Schlosser Gittának és Dr. Borbély Adinának, akik lehetőséget biztosítottak a műszeres analitikai mérések megvalósítására, és tudásukkal is hozzájárultak az eredmények megszületéséhez. Hálás vagyok a közös munkáért mindenkinek, akik szakdolgozóként vagy TDK hallgatóként kapcsolódtak be a közös munkába, különösképp Huba Zsófiának, Gulyás Lilinek és Ertli Bencének. Köszönettel tartozom Dr. Aczél Ágnesnek, aki felkészített az egyetemre, és aki nélkül nem vált volna belőlem gyógyszerész. Köszönöm a családomnak és a páromnak, hogy végig kitartottak mellettem és bátorítottak.